

Plastidäre DNA-Replikation

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

Vorgelegt von

Lars Scharff
aus München

August 2006

1. Gutachter: **Prof. Dr. Hans-Ulrich Koop**
2. Gutachter: **Prof. Dr. Dario Leister**

Tag der mündlichen Prüfung: 5.10.2006

I. Inhalt

I.	Inhalt.....	3
I.1.	Abbildungsverzeichnis.....	5
I.2.	Tabellenverzeichnis.....	6
I.3.	Abkürzungsverzeichnis.....	7
II.	Zusammenfassung.....	9
III.	Einleitung.....	10
III.1.	Plastiden.....	10
III.2.	Struktur der plastidären DNA.....	11
III.3.	Replikation plastidärer DNA.....	16
III.4.	An der DNA-Replikation beteiligte Proteine.....	17
III.5.	Bisher für die Analyse verwendete Methoden.....	18
III.6.	Plastiden-Transformation.....	21
III.7.	Zielsetzung.....	22
IV.	Material und Methoden.....	24
IV.1.	Material.....	24
IV.1.1.	Chemikalien.....	24
IV.1.2.	Transformationsvektoren/Plasmide:.....	24
IV.1.3.	Sonden.....	27
IV.1.4.	Primer.....	28
IV.1.5.	Antibiotika.....	29
IV.1.6.	Bakterienstämme.....	29
IV.1.7.	Enzyme.....	29
IV.1.8.	DNA-Längenstandards.....	30
IV.1.9.	Molekularbiologische “kits”.....	30
IV.1.10.	Verbrauchsmaterial.....	31
IV.1.11.	Geräte.....	31
IV.1.12.	Software.....	32
IV.1.13.	Datenbanken.....	32
IV.1.14.	Medien.....	33
IV.2.	Methoden.....	37
IV.2.1.	Molekularbiologische Methoden.....	37
IV.2.2.	Plastiden- Transformation.....	46
IV.2.3.	Analyse der Transformanten.....	50
V.	Ergebnisse.....	58
V.1.	Inaktivierung der Replikationsursprünge <i>oriA</i> und <i>oriB</i>	58
V.1.1.	Deletion von <i>oriA</i> und <i>oriB2</i>	58
V.1.2.	Inaktivierung von <i>oriB1</i> ohne gleichzeitige Inaktivierung von <i>ycf1</i>	63
V.1.3.	Ansätze für die Entfernung aller <i>oriA</i> - und <i>oriB</i> -Kopien.....	67
V.2.	Analyse des Wildtyps und der Deletionslinien mittels PFGE.....	67
V.2.1.	Struktur des Plastoms <i>in vivo</i>	67
V.2.2.	Charakterisierung der Enden von linearen oder teilweise linearen ptDNA-Molekülen.....	68
V.2.3.	Kartierung von Enden linearer Moleküle in Linien mit inaktivierten Ori.....	74
V.2.4.	Kartierung von Enden linearer Moleküle mittels Southern-Analyse.....	78
V.2.5.	Entwicklungsabhängigkeit.....	78
VI.	Diskussion.....	80
VI.1.	Inaktivierung von <i>oriA</i> - und <i>oriB</i> -Elementen.....	80
VI.1.1.	Ko-Transformation mit zwei Vektoren.....	81
VI.1.2.	Übertransformation bereits vorhandener Deletionsmutanten.....	81

VI.1.3.	Inaktivierung von <i>oriB1</i>	81
VI.1.4.	Können alle <i>oriA</i> - und <i>oriB</i> -Kopien inaktiviert werden?.....	82
VI.2.	Struktur des Plastoms <i>in vivo</i>	83
VI.2.1.	Wie sind die Monomere verknüpft?.....	84
VI.2.2.	Lineare Moleküle mit definierten Enden	86
VI.2.3.	DNA-Struktur und Replikation	87
VI.2.4.	Die Struktur der ptDNA bei $\Delta oriA$ - und $\Delta oriB$ -Linien	88
VI.3.	Kartierung der Enden linearer und teilweise linearer Moleküle	89
VI.3.1.	Korrelation der Enden mit bekannten Replikationsursprüngen	89
VI.3.2.	Kartierung zusätzlicher Enden	91
VI.3.3.	Kartierung der Enden in $\Delta oriA$ -Linien.....	92
VI.3.4.	Stellen die Enden Replikationsterminationsstellen dar?	93
VI.4.	Entwicklungsspezifische Unterschiede?	95
VI.5.	Lineare Enden und das bisherige Modell der plastidären DNA-Replikation.....	96
VI.6.	Wie werden Enden linearer Moleküle erhalten?	97
VI.7.	Vergleich zu Mitochondrien.....	99
VI.8.	Vergleich zu Bakterien und Phagen	100
VI.9.	Ausblick	105
VI.10.	Fazit.....	106
VII.	Literatur.....	108
VIII.	Danksagung.....	116
IX.	Lebenslauf.....	117
X.	Erklärung.....	118

I.1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung III-1 Tabak-Plastom	11
Abbildung III-2 PFGE	12
Abbildung III-3 Verzweigter Komplex	13
Abbildung III-4 ptDNA-Menge	15
Abbildung III-5 θ -Replikation	17
Abbildung III-6 σ -Replikation	17
Abbildung IV-1 pA4	24
Abbildung IV-2 pB2	24
Abbildung IV-3 pB2kan	24
Abbildung IV-4 pKKm	24
Abbildung IV-5 pUC18	25
Abbildung IV-6 pUCnptII	25
Abbildung IV-7 pGEMPNG1014a	25
Abbildung IV-8 pGEMPNG1014anptII	25
Abbildung IV-9 pKCZ	25
Abbildung IV-10 pKCZglpK	25
Abbildung IV-11 pKCZnptII	26
Abbildung IV-12 pB2nptII	26
Abbildung IV-13 pUCInsL	26
Abbildung IV-14 pUCInsLaadA	26
Abbildung IV-15 pB1mod contr aadA	26
Abbildung IV-16 pB1mod contr nptII	26
Abbildung IV-17 pB1mod nptII	27
Abbildung IV-18 Schema des „Model PDS-1000/He Biolistic [®] Particle Delivery System“ (Bio-Rad, München)	48
Abbildung IV-19 Southern-Transfer (Kapillar-Methode)	55
Abbildung V-1 PCR-Analyse Ko-Transformation	58
Abbildung V-2 pB2kan	59
Abbildung V-3 pKCZ nptII	59
Abbildung V-4 Southern-Analyse zum Nachweis der Integration von pKCZnptII	60
Abbildung V-5 pB2nptII	61
Abbildung V-6 Southern-Analyse zum Nachweis von $\Delta oriA$	62
Abbildung V-7 Southern-Analyse: Nachweis $\Delta oriB2$	61
Abbildung V-8 PCR-Analyse <i>copy correction oriB2</i>	63
Abbildung V-9 <i>stem loop</i> des <i>oriB1</i>	63
Abbildung V-10 pB1mod contr aadA	64
Abbildung V-11 Southern-Analyse: Nachweis der Integration von pB1mod contr aadA	64
Abbildung V-12 pB1mod nptII	65
Abbildung V-13 PCR- und Southern-Analysen: Nachweis der mutierten <i>oriB1</i> -Sequenz	66
Abbildung V-14 PFGE-Analyse der ptDNA von <i>Nicotiana tabacum</i>	68
Abbildung V-15 Kartierung der Enden mittels PFGE und Southern-Analysen	69
Abbildung V-16 Position der Enden	73
Abbildung V-17 Kartierung der Enden einer $\Delta oriA$ -Linie	74
Abbildung V-18 Vergleich der kartierten Enden des Wildtyps	76

und einer $\Delta oriA$ -Linie	
Abbildung V-19 Kartierung mittels Southern-Analyse	78
Abbildung V-20 Dot-Blot-Analyse	79
Abbildung VI-1 Erklärung für die detektierten Enden	85
Abbildung VI-2 Homologe Enden	103

I.2. Tabellenverzeichnis

Tabelle IV-1: Sonden für den Nachweis transformierter Linien.....	27
Tabelle IV-2: Sonden für PFGE-Analysen	27
Tabelle IV-3: Primer	28
Tabelle IV-4: Verwendete Antibiotika.....	29
Tabelle IV-5 PCR-Analyse der plastidären Transformanten	50
Tabelle V-1 Enden von linearen oder teilweise linearen Molekülen.....	71
Tabelle V-2: Korrelation der kartierten Enden von linearen oder teilweise linearen ptDNA-Molekülen mit bekannten Replikationsursprüngen bzw. deren Lokalisation in den <i>inverted repeats</i> und <i>single copy</i> -Regionen.	72
Tabelle V-3 Fragment-Klassen einer $\Delta oriA$ -Linie (282-14).....	75
Tabelle V-4 Verteilung der Enden bei einer $\Delta oriA$ -Linie im Vergleich zum Wildtyp.....	77

I.3. Abkürzungsverzeichnis

Δ	Delta, Symbol für deletierte Sequenz, z.B ein deletierter Ori
θ	Theta-Replikation, <i>displacement loop</i> -Mechanismus
σ	Sigma-Replikation, <i>rolling circle</i> -Mechanismus
A	Desoxyadenylat/ Adenylat
Abb	Abbildung
BAP	6-Benzylamino-Purin
bp	Mass für die Länge einer doppelsträngigen DNA-Sequenz
C	Desoxycytidylat/ Cytidylat
CTAB	Cetrylmethylammoniumbromid (C ₁₉ H ₄₂ BrN)
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DB	5'-Sequenz der kodierenden Region (<i>downstream box</i>)
DMSO	Dimethyl-Sulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure, englische Abkürzung, deutsch: DNS
dNTP	Desoxyribonucleintriphosphat
dsDNA	Doppelsträngige DNA
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat
et al.	und weitere
FISH	<i>fiber-based fluorescence in situ hybridization</i>
G	Desoxyguanylat/ Guanylat
g	Gramm oder Erdbeschleunigung (9,81 ms ⁻²)
g10L	<i>gene 10 leader</i> , 5'-UTR des Gens 10 aus T7-Phagen
h	Stunde
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-N'-(2-Ethan-Sulfonsäure)
<i>IR_A</i>	<i>inverted repeat A</i> , Teil des Plastoms
<i>IR_B</i>	<i>inverted repeat B</i> , Teil des Plastoms
kb	Kilobasenpaare (1 kb = 1000 bp)
LB	Luria-Bertani-Medium, Vollmedium für Bakterienkulturen
<i>LSC</i>	<i>large single copy</i> -Region, Teil des Plastoms
MES	2-(N-Morpholino)-Ethan-Sulfonsäure
min	Minuten
mtDNA	Mitochondriale DNA

NAA	α -Naphthyl-Essigsäure
Ori	Replikationsursprung (<i>origin of replication</i>)
p.a.	pro analysi, Reinheitsgrad für Chemikalien
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
PFGE	Pulsfeldgelelektrophorese
PMSF	Phenylmethylsulfonylfourid
psi	Einheit des Drucks (,pounds per square inch‘)
ptDNA	Plastidäre DNA
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RNA	Ribonukleinsäure, englische Abkürzung, deutsch RNS
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	<i>small single copy</i> -Region, Teil des Plastoms
T	Desoxythymidylat
T _a	Hybridisierungstemperatur der Primer (<i>annealing</i>)
Tab	Tabelle
T _m	Schmelztemperatur der Primer (<i>melting</i>)
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	Uridylat
u	Maß für die Enzymaktivität (<i>unit</i>)
upm	Umdrehungen pro Minute
UTR	nicht-translatierte Region einer mRNA (<i>untranslated region</i>)
v/v	Volumen % pro Volumen (,volume per volume‘)
Vol	Volumen
w/v	Gewicht % pro Volumen (,weigth per volume‘)

II. Zusammenfassung

Die plastidäre DNA höherer Pflanzen wird allgemein als zirkuläres Molekül von der Größe eines Monomers beschrieben. Die DNA-Replikation soll von einem Paar Replikationsursprünge ausgehen. Mittels θ - (*displacement loop*) und σ -Replikation (*rolling circle*) würden aus zirkulären Ausgangsprodukten erneut zirkuläre Produkte entstehen. In *Nicotiana tabacum* sollen diese Mechanismen auf zwei beschriebenen Replikationsursprüngen beruhen: *oriA* und *oriB*. In früheren Arbeiten wurde bereits gezeigt, dass *oriA* nicht essentiell ist, aber vermutet, dass eine Kopie des *oriB* unverzichtbar sei. Mittels Plastidentransformation wurde jetzt auch gezeigt, dass plastidäre DNA-Replikation auch erfolgt, wenn beide Kopien des *oriB* inaktiviert sind. In weiteren Experimenten konnten in einer Linie drei der vier Ori deletiert werden. Untersuchungen mittels Pulsfeldgelelektrophorese und Southern-Analysen zum Replikationsmechanismus wiesen auf lineare ptDNA-Moleküle mit definierten Enden hin. Eine mögliche Erklärung für diese Enden wäre, dass diese an der Position von Replikationsursprüngen liegen. Tatsächlich wurde eine entsprechende Korrelation mit *oriA* – und weniger deutlich – mit *oriB* gefunden. Andere Enden liegen auf Positionen, auf denen in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Glycine max*, *Oenothera elata ssp. hookeri*, *Oryza sativa* und *Zea mays* Replikationsursprünge beschrieben wurden. Dazu kommen noch weitere mögliche Replikationsursprünge. Die Mechanismen der plastidärer DNA-Replikation werden basierend auf diesen neuen Ergebnissen und neuen Erkenntnissen in der Literatur diskutiert.

III. Einleitung

III.1. Plastiden

Plastiden gehören neben dem Zellkern und den Mitochondrien zu den Kompartimenten in pflanzlichen Zellen, die DNA enthalten. Plastiden haben in verschiedenen Geweben unterschiedliche Aufgaben und entsprechend existieren unterschiedliche Typen: Proplastiden, Chloroplasten (Gerontoplasten in herbstlichen Blättern), Chromoplasten, Leukoplasten, Amyloplasten, Proteinoplasten, Elaioplasten und Etioplasten. Diese Typen entwickeln sich entweder aus Proplastiden oder durch Umwandlung aus anderen Typen. Plastiden sind verantwortlich für die Photosynthese (Chloroplasten), Speichern von Stärke (Amyloplasten), Fetten (Elaioplasten) und Proteinen (Proteinoplasten), Assimilation von Stickstoff, Schwefel und Phosphor und Synthese u.a. von Aminosäuren, Lipiden, Stärke und Pigmenten. Da letztere Stoffwechselwege für alle pflanzlichen Zellen essentiell sind, findet man auch in nicht photosynthetisch aktiven Zellen und Zellen ohne entsprechende Speicherfunktion Plastiden. Diese Formen von Plastiden in nicht-grünen Geweben werden unter dem Begriff Leukoplasten zusammengefasst.

Plastiden haben sich aus photosynthetisch-aktiven Eubakterien entwickelt, genauer aus Cyanobakterien. Im Zuge der Entwicklung der Endosymbiose wurde ein Großteil der Gene des Vorläufers der Plastiden in den Kern transferiert (ca. 4500 Gene) und nur 60 bis 264 Gene sind noch im Plastom erhalten (Martin et al, 2002, publizierte Plastom-Sequenzen auf Entrez Genome, s. IV.1.12). Die Gene, die im Plastom verblieben, lassen sich in drei Hauptgruppen einteilen:

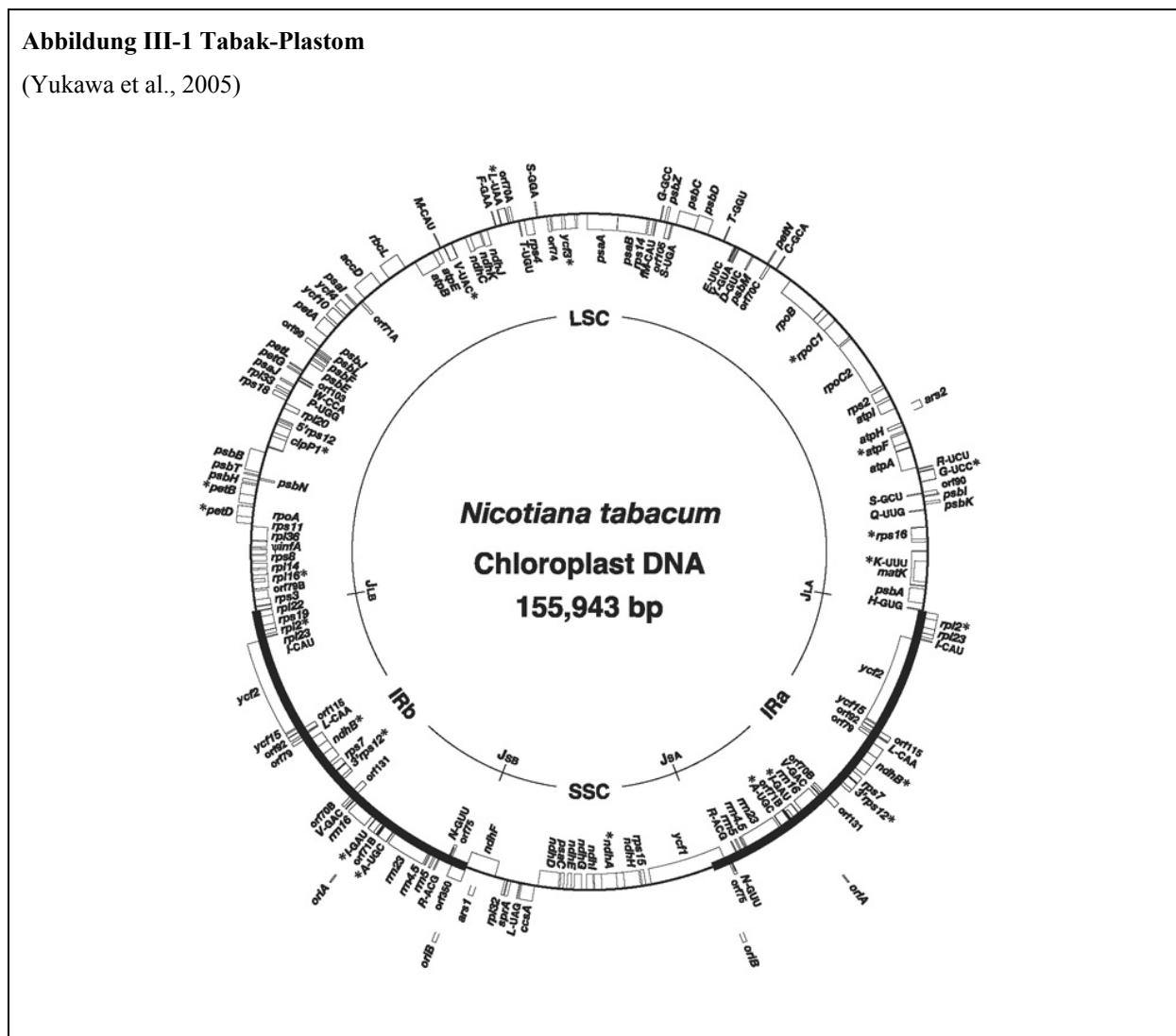
- 1.) Gene, deren Genprodukte an der Photosynthese beteiligt sind, z.B. Gene, die für Untereinheiten des Photosystems I (PSI), des Photosystems II (PSII), des Cytochrom b6/f-Komplexes, der ATP-Synthase, des NDH-Komplexes und der Rubisco kodieren sowie Gene, deren Genprodukte am Zusammenbau dieser Komplexe beteiligt sind.
- 2.) Gene, deren Produkte an der Genexpression beteiligt sind, z.B. Gene für die plastidär kodierte RNA-Polymerase, ribosomale Proteine, rRNA, tRNA, *elongation factor* EF-Tu und Maturase.
- 3.) Gene, die an der Biogenese der Plastiden beteiligt sind, z.B. *accD* und *clpP* (Wakasugi et al., 2001).

III.2. Struktur der plastidären DNA

Die plastidäre DNA (ptDNA) ist in Nukleoiden organisiert, d.h. in distinkten Regionen der Plastide, die aber nicht von einer Membran umgeben sind (Sato et al., 2003). Diese Nukleoide erinnern an ihre bakteriellen Gegenstücke, unterscheiden sich aber in ihrer Zusammensetzung. Während z.B. in der Rotalge *Cyanidioschyzon merolae* und in der Cryptophyte *Guillardia theta* noch ein Homolog zum bakteriellen DNA-Bindeprotein HU die DNA kompaktiert (Wang & Liu, 1991, Kobayashi et al, 2002), übernimmt in höheren Pflanzen die Sulfit-Reduktase diese Funktion (Sato et al., 2001). In Proplastiden liegt die DNA in einem Nukleoid konzentriert vor und die DNA ist über das PEND-Protein an die innere Hüllmembran gebunden (Sato et al., 1993). In Chloroplasten existieren acht bis 40 Nukleoide (Kuroiwa et al., 1981) und das DNA-Bindeprotein MFP1 scheint dafür verantwortlich zu sein, dass die DNA an die Thylakoide gebunden ist (Jeong et al., 2003).

Abbildung III-1 Tabak-Plastom

(Yukawa et al., 2005)

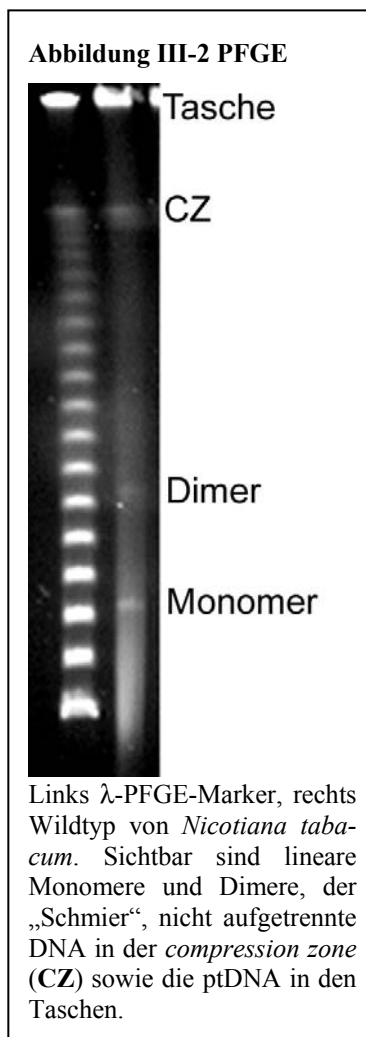


Die Größe des Plastoms von Algen und höheren Pflanzen schwankt zwischen 35 kb (*Eimeria tenella*) und 204 kb (*Chlamydomonas reinhardtii*), wobei die Größe nicht direkt mit dem Gen-Gehalt korreliert (publizierte Plastom-Sequenzen auf Entrez Genome).

Das Monomer des typischen Plastoms höherer Pflanzen besteht aus vier Regionen: zwei *inverted repeat* (IR_A und IR_B), die u.a. die Gene für die rRNA und die bekannten Replikationsursprünge *oriA* und *oriB* (Kunnimalaiyaan & Nielsen, 1997b) enthalten und die den Rest des Plastoms in eine *large single copy*-Region (*LSC*) und eine *small single copy*-Region (*SSC*) teilen (s. Abb. III-1).

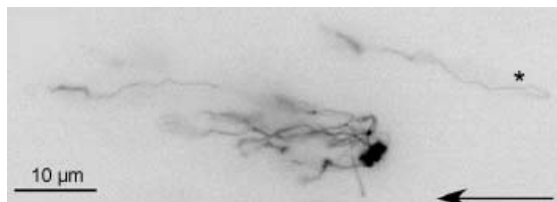
Die meisten Lehrbücher beschreiben die Struktur der plastidären DNA als zirkuläres Molekül von der Größe des Monomers (z.B. Lodish et al., 1995, Buchanan et al., 2000). Dies stimmt auch mit Restriktionskarten (z.B. Suguira et al., 1986) und Sequenzierungen (z.B. Shinozaki et al., 1986, Yukawa et al., 2005) überein, und zirkuläre Moleküle dieser Größe wurden auch detektiert (z.B. Kolodner & Tewari, 1972, Herrmann et al., 1975, Lilly et al., 2001). Aber schon Kolodner & Tewari (1972) fanden, dass nur 37% der ptDNA von *Pisum sativum* zirkulär war, während der Rest überwiegend linear vorlag. Trotzdem wurden andere Strukturen außer der zirkulären Form lange als Artefakt des Isolationsprozesses betrachtet.

Deng et al. (1989) fanden mittels Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE), dass die ptDNA von *Spinacia oleracea* auch aus linearen Oligomeren besteht, wobei immer noch unklar war, ob diese linearen Fragmente Artefakte waren oder nicht. Die gleiche Beobachtung wurde bei *Nicotiana tabacum* gemacht (Backert et al., 1995, Lilly et al., 2001, Swiatek et al., 2003): es wurden lineare Moleküle von Monomer- bis Tetramer-Größe neben einem „Schmier“ im Gel beobachtet, während ein Großteil der DNA aber in den Taschen verblieb (s. Abb. III-2).



Mittels FISH konnten sowohl zirkuläre als auch lineare Monomere und Multimere detektiert werden, wobei in *Nicotiana tabacum* 45%, *Pisum sativum* 25% und in *Arabidopsis thaliana* 42% der Moleküle zirkulär waren. In *Medicago truncatula*, *Nicotiana tabacum* und *Zea mays* wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie (Ethidiumbromid gefärbter) ptDNA große, lineare, verzweigte Komplexe gefunden (Oldenburg & Bendich, 2004a, Shaver et al., 2005, s. Abb III-3). Diese Komplexe machten 93% der Masse der ptDNA aus, stellten aber nur 6% der Zahl der Moleküle. Die verzweigten Komplexe können zumindest einem Teil der 17% der nicht-klassifizierten Moleküle entsprechen, die Lilly et al. (2001) in *Nicotiana tabacum* mit FISH beobachteten.

Abbildung III-3 Verzweigter Komplex



Linearer, verzweigter Komplex und lineares Molekül (*) aus *Zea mays*, die mittels Fluoreszenzmikroskopie beobachtet wurden. Der Pfeil zeigt das angelegte elektrische Feld an (Oldenburg & Bendich, 2004a).

Der Anteil der ptDNA, der bei PFGE in den Taschen bleibt, besteht wahrscheinlich aus zirkulären Molekülen und linearen, verzweigten Komplexen (Oldenburg & Bendich, 2004a). Obwohl zirkuläre plastidäre DNA bei *Plasmodium falciparum* mittels PFGE beobachtet wurde (Williamson et al., 2002), blieb bei *Zea mays* der Großteil der zirkulären Moleküle in den Taschen und eine *supercoiled*-Bande war nur selten zu beobachten (Oldenburg & Bendich, 2004a). Zirkuläre Moleküle verhalten sich unter unterschiedlichen PFGE-Bedingungen verschieden zu linearen Marker-Molekülen, so dass sie identifiziert werden können (Williamson et al., 2002). In *Zea mays* machen zirkuläre Moleküle 93% der Zahl der Moleküle, aber nur 7% der Masse der DNA aus, die bei PFGE in den Taschen verbleiben (Oldenburg & Bendich, 2004a).

Ein weiterer Hinweis, dass die linearen ptDNA-Moleküle keine Isolationsartefakte waren, wurde durch die Kartierung von definierten Enden erhalten. Nachdem die ptDNA von *Zea mays* mit einem Restriktionsenzym, das nur einmal pro Monomer schneidet, inkubiert wurde, konnten die Enden der linearen Moleküle zu Positionen kartiert werden, die Homologien zu den *oriA* und *oriB* von *Oenothera elata ssp. hookeri* und *oriA* von *Nicotiana tabacum* hatten. Dazu gab es Enden, von denen angenommen wurde, dass eines der Position des in *Zea mays* schon früher beschriebenen Replikationsursprungs (Gold et al, 1987, Carrillo & Bogorad, 1988) in der *large single copy region* entspricht (Oldenburg & Bendich, 2004a). Diese Daten weisen

darauf hin, dass die linearen Moleküle und der „Schmier“, der möglicherweise aus Replikationsintermediaten besteht, Produkte der Replikation sind.

In einzelnen Zellkulturen, die aus albinotischen Pflanzen gewonnen wurden und deren plastidäre DNA große Deletionen aufweisen, liegt die gesamte DNA linear vor. Die linearen Monomere und Multimere weisen an den Enden eine *hairpin*-Struktur auf (Ellis & Day, 1986, Harada et al., 1992, Cahoon et al., 2003). Die Ursache für diese Beobachtung ist unklar, könnte aber darauf hinweisen, dass in diesen Zellkulturen nur ein Replikationsmechanismus aktiv ist, der lineare Moleküle produziert. Da in diesen Zellkulturen auch die *inverted repeats (IR)* deletiert sind, kann dies z.B. am Fehlen der dort lokalisierten Replikationsursprünge liegen. Allerdings wurden auch im Wildtyp von *Hordeum vulgare* lineare Moleküle mit *hairpin*-Strukturen an den Enden gefunden, die ca. 2% der plastidären DNA ausmachten (Collin & Ellis, 1991), so dass es sich wohl um einen Mechanismus handelt, der auch im Wildtyp aktiv ist.

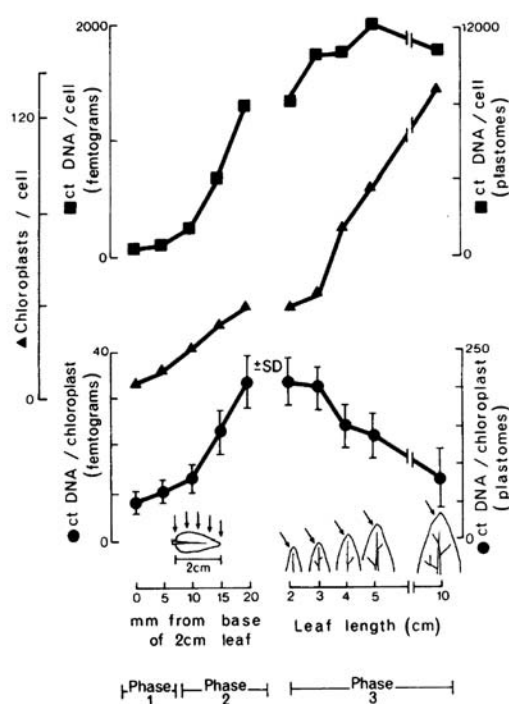
Die plastidäre DNA von *Zea mays*, *Nicotiana tabacum* und *Medicago truncatula* wird während der Blattentwicklung prozessiert, wobei komplexe, verzweigte Strukturen in überwiegend lineare Moleküle umgewandelt werden (Oldenburg & Bendich, 2004b, Shaver et al., 2005). Es wurde auch beobachtet, dass in reifen Blättern von *Zea mays* und *Arabidopsis thaliana* im Gegensatz zu *Nicotiana tabacum*, *Pisum sativum* und *Medicago truncatula* keine ptDNA detektierbar ist (Rowan et al., 2004, Shaver et al., 2006). Diese Daten werden allerdings angezweifelt. Mittels Southern-Analysen wurde herausgefunden, dass in *Nicotiana tabacum* und *Arabidopsis thaliana* das Verhältnis zwischen plastidärer und nukleärer DNA gleich bleibt (Li et al., 2005). Ältere Arbeiten zeigen dagegen, dass es zumindest bei der Entwicklung der Proplastiden zu Chloroplasten eine Zunahme der plastidären DNA gibt und anschließend die ptDNA-Menge pro Chloroplast leicht abnimmt (Boffoy et al., 1979, Lamppa & Bendich, 1979, Lawrence & Possingham, 1986a und 1986b, Baumgartner et al., 1989, Sodmergen et al., 1989, Fujie, 1994). Die DNA-Menge im Kern ist ebenfalls nicht konstant, da die Ploidie des Kerns während der Blattentwicklung zunimmt (Galbraith et al., 1991) und deshalb als Vergleichswert ungeeignet ist. Wahrscheinlich nimmt die ptDNA-Menge in frühen Stadien der Blattentwicklung bei der Umwandlung der Proplastiden in Chloroplasten stark zu. In diesen Stadien dürfte auch der Großteil der DNA-Replikation stattfinden, deren Umfang danach abnimmt, so dass dadurch die ptDNA-Menge pro Chloroplast durch Teilung der Chloroplasten sinkt, während die ptDNA-Menge pro Zelle in deutlich geringerem Umfang zurückgeht (siehe Abb III-4).

Plastiden sind polyploid, wobei die Anzahl der Kopien von 80 pro Zelle in *Chlamydomonas reinhardtii* bis zu 10000 Kopien in Blattzellen höherer Pflanzen reicht (Bendich, 1987). Wie oben schon erwähnt, ist es momentan umstritten, in welchem Umfang der Ploidiegrad des Plastoms sich während der Entwicklung der Plastiden verändert. Gesichert scheint, dass in nicht-grünen Geweben die Anzahl der Kopien im Vergleich zu grünen Geweben geringer ist (Aguettaz et al., 1987, Baumgartner et al., 1989). Deshalb gibt es die Vermutung, dass die Zunahme der Kopienzahl dazu dient, die Expression der photosynthetischen Gene zu regulieren und notwendig ist, um eine hohe Expression dieser Gene zu erreichen. Bei *Chlamydomonas reinhardtii* wurde eine Zunahme des ptDNA-Gehalts bei mixotrophen Bedingungen im Vergleich zu photoautotrophen Bedingungen beobachtet. Eine erhöhte Kopienzahl der Gene hatte aber keine Auswirkung auf die Proteinmenge in den Photosynthesystemen. Selbst eine Reduktion der Kopienmenge durch Hemmung der Replikation hatte keine Auswirkungen (Eberhardt et al., 2002), so dass es unwahrscheinlich ist, dass die Regulation der Kopienzahl für die Regulation der Genexpression wichtig ist. Andere Arbeiten zeigten auch, dass posttranskriptionelle Prozesse

wichtiger für die Regulation der Proteinmenge sind als die Regulation der Transkription (z.B. Eibl et al., 1999, siehe auch Zerges, 2000).

Eine alternative Erklärung für die hohe Kopienzahl des Plastoms ist, dass diese der Vermeidung von *Muller's ratchet* (Muller, 1964) dient. *Muller's ratchet* beschreibt einen Prozess, in dem Genome von sich asexuell vermehrenden Populationen Mutationen unumkehrbar akkumulieren. *Muller's ratchet* dient als Erklärung, warum es sexuelle Vermehrung und damit Rekombination zwischen verschiedenen Genomen gibt. Das Plastom wird asexuell, in der Regel maternal vererbt und Rekombination

Abbildung III-4 ptDNA-Menge



ptDNA-Menge (ctDNA) pro Chloroplast und pro Zelle sowie die Zahl der Plastiden pro Zelle in verschiedenen Stadien der Blattentwicklung bei *Spinacia oleracea* (Lawrence & Possingham, 1986b).

zwischen verschiedenen Plastiden ist sehr selten – selbst wenn es eine biparentale Vererbung gibt (Birky et al., 1995). Nur mittels starker Selektion ist Rekombination zwischen Plastiden verschiedener Eltern nachweisbar (Medgyesy et al., 1985, Thanh & Medgyesy, 1989). Unter diesen Umständen ist es überraschend, dass die Mutationsrate plastidärer Gene niedriger ist als die nukleärer Gene (Wolfe et al., 1987). *copy correction* bzw. *gene conversion*, d.h. Rekombination zwischen verschiedenen Kopien, wurde in Plastiden nachgewiesen (Lemieux & Lee, 1987, Birky & Walsh, 1992, Khakhlova & Bock, 2006) und kann die niedrige Mutationsrate erklären. Da in photosynthetischen Geweben die Gefahr von Mutationen durch Radikalbildung bei der Photosynthese höher ist, würde eine hohe Kopienzahl der ptDNA in diesen Geweben Sinn machen.

Im Gegensatz zu der vereinfachten Vorstellung, dass die ptDNA als zirkuläres Monomer vorliegt, besteht sie tatsächlich aus linearen und zirkulären Multimeren, sowie linearen, verzweigten, komplexen Strukturen. Wie diese Struktur mit der Replikation zusammenhängt, ist unklar, da sowohl die linearen Moleküle, als auch die linear verzweigten Komplexe weder als Edukt, noch als Produkt dem bisherigen Modell der DNA-Replikation entsprechen (siehe III.3). Umstritten sind zudem die Prozessierung und die Entwicklung des Ploidiegrads des Plastoms.

III.3. Replikation plastidärer DNA

Das bisherige Modell der DNA-Replikation geht von zirkulären DNA-Molekülen als Edukt und Produkt aus. Die Replikation mittels eines θ -*D-loop*-Mechanismus (s. Abb. III-5) startet an zwei Replikationsursprüngen unidirektional. Nach dem die Replikation an den dem Replikationsursprung gegenüberliegenden Enden angeht, wird sie mittels eines σ -*rolling circle*-Mechanismus (s. Abb. III-6) fortgesetzt (Kolodner & Tewari, 1975). Zwei Replikationsursprünge (*origin of replication*, kurz Ori), die sowohl θ -, als auch σ -Replikation initiieren können, wurden in *Nicotiana tabacum* gefunden und als *oriA* und *oriB* bezeichnet (Lu et al., 1996, Kunnimalaiyaan et al., 1997, Kunnimalaiyaan & Nielsen, 1997b). *oriA* und *oriB* liegen in den *inverted repeats* und sind somit je zwei Mal pro Monomer vorhanden. Die Funktionalität dieser Replikationsursprünge wurde u.a. auch in isolierten Chloroplasten überprüft (Lugo et al., 2004). Allerdings konnten beide *oriA*-Kopien und eine *oriB*-Kopie in verschiedenen Linien in allen Plastom-Kopien, d.h. homoplastomisch, entfernt werden (Mühlbauer et al., 2002). Es konnte nur die *oriB*-Kopie homoplastomisch entfernt

werden, die innerhalb des *orf350* liegt, während das Gegenstück innerhalb des essentiellen Gens *ycf1* (Drescher et al., 2000) liegt und deshalb nicht deletiert werden konnte. Dies zeigt, dass die DNA-Replikation auch funktioniert, wenn beide *oriA* bzw. eine *oriB*-Kopie deletiert sind. Die DNA-Replikation ist somit nicht auf einen θ -Mechanismus angewiesen, der gleichzeitig an *oriA* und *oriB* initiiert wird. In Suspensionszellkulturen wurde ein weiterer putativer Replikationsursprung gefunden, der sich ebenfalls in den *inverted repeats* befindet (Takeda et al., 1992). Dieser Replikationsursprung ist wahrscheinlich homolog zu einem Replikationsursprung, der in Suspensionskulturen von *Oryza sativa* einen bidirektionalen Mechanismus initiiert (Wang et al., 2002). In *Oryza sativa* werden dazu verschiedene Replikationsursprünge in Suspensionskulturen, Koleoptilen und reifen Blättern verwendet. Während in Koleoptilen ebenfalls ein bidirektionaler Replikationsmechanismus existiert, scheint der Mechanismus in Blättern unidirektional zu sein (Wang et al., 2003).

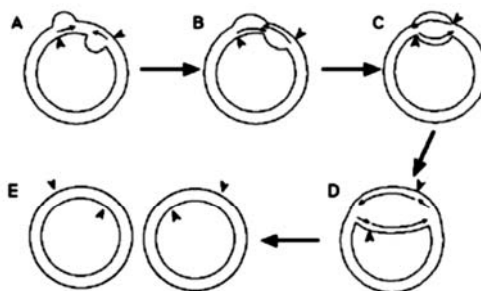
Die neueren Arbeiten deuten also darauf hin, dass zumindest der von Kolodner & Tewari (1975) postulierte Mechanismus nicht der einzige Mechanismus der DNA-

Replikation in Plastiden ist sondern wahrscheinlich entwicklungsabhängig verschiedene Mechanismen existieren. Dazu müssen auch andere Mechanismen für die gefundenen linearen und komplexen Strukturen verantwortlich sein.

III.4. An der DNA-Replikation beteiligte Proteine

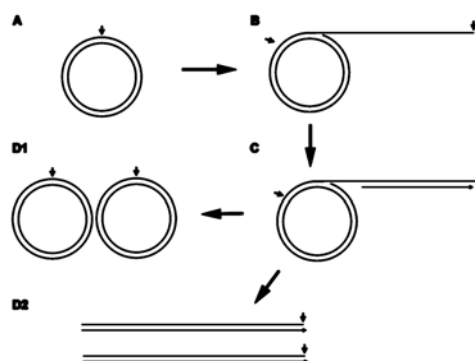
Die für die DNA-Replikation notwendigen Proteine wie DNA-Polymerasen, Primase und Topoisomerasen sind nicht im Plastom kodiert sondern im Zellkern. Die Replikation funktioniert sowohl in Plastiden ohne Ribosomen (Walbot & Coe, 1979, Herrmann & Feierabend, 1980, Hübschmann & Börner, 1998) als auch, wenn die plasti-

Abbildung III-5 θ -Replikation



Kleine Pfeile zeigen die Position der Ori (Heinhorst & Cannon, 1993).

Abbildung III-6 σ -Replikation



Kleine Pfeile zeigen die Position der Ori. Die Produkte können entweder zirkulär (D1) oder linear (D2) sein.

däre Gen-Expression gehemmt ist (Heinhorst et al., 1985, Rapp & Mullet, 1991). Deshalb ist es auch unwahrscheinlich, dass eines der plastidären Gene (z.B. *ycf1*, Drescher et al., 2000), denen bisher keine Funktion zugeordnet werden konnte, eine essentielle Rolle bei der DNA-Replikation spielt. Das Wissen über die beteiligten Proteine ist bisher beschränkt. Identifiziert wurden bisher eine Gyrase (Cho et al., 2004, Wall et al., 2004) und eine DNA-Polymerase I (Gaikwad et al., 2002, Kimura et al., 2002, Mori et al., 2005), die beide eubakteriellen Ursprungs sind. Es existiert die Hypothese, dass andere an der Replikation beteiligte Proteine ursprünglich aus Phagen stammen (Filee & Fortere, 2005), da einerseits in Plastiden eine RNA-Polymerase des Phagen-Typs aktiv ist, die wie die DNA membrangebunden ist (Azevedo et al., 2006). Andererseits sind die Proteine, die in menschlichen Mitochondrien Primase-, Helikase- und DNA-Polymerase-Funktion haben, mit Phagen-Proteinen verwandt (Shutt & Grey, 2006). Auch das plastidär lokalisierte Pfpex von *Plasmodium falciparum* hat Primase-, Helikase-, DNA-Polymerase- und 3'-5'-Exonuclease-Aktivität und ist mit dem Gen 4 aus T7-Phagen und Twinkle aus menschlichen Mitochondrien verwandt (Seow et al., 2005).

III.5. Bisher für die Analyse verwendete Methoden

Die oben dargestellten Ergebnisse über die plastidäre DNA-Replikation beruhen auf Arbeiten an folgenden Arten:

- *Arabidopsis thaliana* (Draper & Hays, 2000, Wall et al., 2004, Mori et al., 2005)
- *Chlamydomonas reinhardtii* (Waddel et al., 1984, Wang et al., 1984, Wu et al., 1986, Lou et al., 1987, Wu et al., 1989, Woelfle et al., 1993, Nie & Wu, 1999, Chang et al., 2000)
- *Euglena gracillis* (Koller & Delius, 1982, Ravel-Chapuis et al., 1982)
- *Glycine max* (Hedrick et al., 1993)
- *Marchantia polymorpha* (Tanaka et al., 1984)
- *Nicotiana benthamiana* (Cho et al., 2004)
- *Nicotiana tabacum* (Heinhorst et al., 1985, Suzuki et al., 1992, Takeda et al., 1992, Lu, et al., 1996, Kunnimalaiyaan et al., 1997, Kunnimalaiyaan & Nielsen, 1997b, Sakai et al., 1999, Mühlbauer et al., 2002, Lugo et al., 2004)
- *Oenothera elata ssp. hookeri* (Chiu & Sears, 1992)

- *Oryza sativa* (Kimura et al., 2002, Wang et al., 2002, Wang et al., 2003)
- *Petunia hybrida* (de Haas et al., 1986, de Haas et al., 1987)
- *Pisum sativum* (Kolodner & Tewari, 1975, Meeker et al., 1988; Nielsen et al., 1993, Reedy et al., 1994, Gaikwad et al., 2002)
- *Plasmodium falciparum* (Williamson et al., 2002, Singh et al., 2005, Seow et al., 2005)
- *Spinacia oleracea* (Lawrence & Possingham, 1986)
- *Toxoplasma gondii* (Williamson et al., 2001)
- *Zea mays* (Gold et al., 1987, Carrillo & Bogorad, 1988, Oldenburg & Bendich, 2004a, Oldenburg & Bendich, 2004b)

In den meisten aufgelisteten Arten wurden aber lediglich einzelne Teilbereiche erforscht, wie einzelne an der Replikation beteiligte Proteine, die Replikationsursprünge oder der Umfang der Replikation in verschiedenen Entwicklungsstadien. Umfangreichere Forschung über den Mechanismus wurden lediglich in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Nicotiana tabacum*, *Oryza sativa*, *Pisum sativum* und *Plasmodium falciparum* durchgeführt. Minimal-Ori, d.h. die minimal für die Replikation ausreichenden Sequenzen, wurden nur in *Nicotiana tabacum* (Kunnimalaiyaan & Nielsen, 1997b) definiert. In den meisten Arten wurde dagegen nur die Region bestimmt, in der der Replikationsursprung lokalisiert ist, und nicht der Replikationsursprung selbst.

Zur Untersuchung des Replikationsmechanismus und für die Identifikation der Ori wurden Elektronenmikroskopie (z.B. Kunnimalaiyaan & Nielsen, 1997b), 2D-Gelelektrophorese (z.B. Kunnimalaiyaan et al., 1997), Hybridisierung der naszierenden Stränge (Lu et al., 1996), *primer extension mapping* (z.B. Lu et al., 1996) *in vitro*-Replikation isolierter Elemente (Kunnimalaiyaan & Nielsen, 1997b), *gel mobility shift assay* (z.B. Kunnimalaiyaan et al., 1997), Replikation isolierter Elemente in isolierten Chloroplasten (Lugo et al., 2004), kompetitive PCR (Singh et al., 2005) und Knockouts bekannter Replikationsursprünge (Mühlbauer et al., 2002) verwendet.

Neben den Replikationsursprüngen, Replikationsmechanismen und den beteiligten Proteinen ist die DNA-Struktur für das Verständnis der DNA-Replikation relevant, da die Struktur der Edukte und Produkte Rückschluss auf die Mechanismen ermöglicht. Wie oben beschrieben (s. III.2), steht ein Teil der beobachtenden Strukturen im Wi-

derspruch zu dem bisherigen Modell der DNA-Replikation. Die Struktur der plastidären DNA wurde in folgenden Arten untersucht:

- *Antirrhinum majus* (Herrmann et al, 1975)
- *Arabidopsis thaliana* (Rowan et al., 2004)
- *Beta vulgaris* (Herrmann et al, 1975)
- *Chenopodium album* (Backert et al., 1995)
- *Citrullus lanatus* (Bendich & Smith, 1990)
- *Hordeum vulgare* (Ellis & Day, 1986, Collin & Ellis, 1991)
- *Lactuca sativa* (Kolodner & Tewari, 1979)
- *Malaria fulciparium* (Williamson et al., 2002)
- *Medicago truncatula* (Shaver et al., 2005)
- *Nicotiana tabacum* (Backert et al., 1995, Lilly et al., 2001, Li et al., 2005, Shaver et al., 2005)
- *Oenothera elata ssp. hookeri* (Herrmann et al, 1975)
- *Oryza sativa* (Harada et al., 1992, Sodmergen et al., 1989)
- *Pisum sativum* (Kolodner & Tewari, 1972, Kolodner & Tewari, 1979, Bendich & Smith, 1990, Shaver et al., 2005)
- *Plasmodium falciparum* (Williamson et al., 2002)
- *Spinacia oleracea* (Herrmann et al, 1975, Kolodner & Tewari, 1979, Deng et al., 1989)
- *Toxoplasma gondii* (Williamson et al, 2001)
- *Zea mays* (Cahoon et al., 2003, Oldenburg & Bendich, 2004a, Oldenburg & Bendich, 2004b, Shaver et al., 2005)

Diese Untersuchungen wurden mittels Elektronenmikroskopie (z.B. Kolodner & Tewari, 1972), *fiber-based fluorescence in situ hybridization* (fiber-FISH, Lilly et al., 2001), Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE, z.B. Deng et al., 1989) und Fluoreszenzmikroskopie von Ethiumbromid-gefärbten Molekülen (z.B. Oldenburg & Bendich, 2004a) durchgeführt.

III.6. Plastiden-Transformation

Um das Modell der DNA-Replikation (Kolodner & Tewari, 1975) angesichts der Unklarheiten in Bezug auf die Nutzung der Replikationsursprünge – unterschiedliche Ori in Suspensionskulturen (Takeda et al., 1992) und Blättern (Kunnimalaiyaan & Nielsen, 1997b) – und die Struktur der ptDNA und damit angesichts der Unklarheiten in Bezug auf den Replikationsmechanismus zu überprüfen, wurde ein neuer Ansatz verwendet: die Deletion der beiden definierten Replikationsursprünge (Kunnimalaiyaan & Nielsen, 1997b) *oriA* und *oriB* mittels Plastiden-Transformation (Mühlbauer et al., 2002).

Die erste Transformation eines Plastoms gelang mit der biolistischen Methode bei Defektmutanten der einzelligen Alge *Chlamydomonas reinhardtii* durch Selektion auf die Komplementierung mit dem intakten Gen (Boynton et al., 1988; Blowers et al., 1989). Die erste Plastiden-Transformation höherer Pflanzen führten Svab et al. (1990) durch. Die Selektion erfolgte auf eine mutierte 16S rRNA, die Resistenz gegen Spectinomycin verlieh.

Das Prinzip der biolistischen Methode besteht darin, dass Mikroprojektilen (‘microcarrier’), die aus massereichem und inertem Material, wie Wolfram oder – häufiger – Gold, bestehen und mit DNA komplexiert sind, in die Zellen geschossen werden. Als Antrieb wurde früher Schießpulver, heute wird dagegen Gasdruck verwendet. Am besten ist Helium geeignet, da eine Helium-Druckwelle die Zellen nicht mechanisch beschädigt.

Alternativ zur biolistischen Methode ist es möglich, mit Hilfe von Polyethylenglycol (PEG) Plastiden zu transformieren (Golds et al., 1993, O’Neill et al., 1993, Koop et al., 1996).

Die PEG-Methode wird bei Protoplasten angewendet, also Zellen, deren Zellwand enzymatisch oder mechanisch entfernt wurde. Die genaue Funktionsweise dieser Methode ist unklar. Eine Vorstellung ist, dass das PEG ‘Löcher’ in der Plasmamembranen erzeugt, durch die DNA an ihren Zielort gelangt. Bei der Plastiden-Transformation mit der PEG-Methode könnte es sein, dass sich Plastiden an die Zellmembran anlagern und so die DNA gleichzeitig auch die plastidären Membranen überwindet.

Der Einbau der DNA erfolgt bei beiden Methoden mittels homologer Rekombination gerichtet, wofür ein Mechanismus verantwortlich ist, der homolog zu dem bakteriellen

RecA-System ist (Cerutti et al., 1992, Cerutti et al., 1995, Kavanagh et al., 1999). Da nur wenige Kopien des polyploiden Plastoms anfangs transgen sind, sind Zellteilungen unter Selektionsdruck notwendig um Wildtyp-Kopien zu eliminieren.

Vektoren für die Transformation von Plastiden enthalten Sequenzen des Plastoms für die Insertion mittels homologer Rekombination, die die Genkassetten flankieren. Damit ist sowohl eine gerichtete Insertion als auch eine Mutagenese oder Deletion von Sequenzen möglich. Neben einem Selektionsmarker für die Transformation der Pflanze sind eine Antibiotika-Resistenz für die Selektion des Plasmids in Bakterien für die Klonierung sowie ein dazu ebenfalls notwendiger Ori vorhanden.

Als Selektionsmarker für die Plastiden-Transformation stehen *aadA*, das für eine Aminoglycosid-3'-Adenyltransferase kodiert und Resistenz gegen Spectinomycin und Streptomycin vermittelt (Svab & Maliga, 1993) sowie *aphA-6* (Huang et al., 2002) und *nptII* (Carrer et al., 1993), die beide für Kanamycin entgiftende Aminoglycosid-3'-Phosphotransferasen kodieren, zur Verfügung. Für den ebenfalls publizierten Selektionsmarker *badh* (Daniell H. et al., 2001), eine Betainaldehyd-Dehydrogenase, die Resistenz gegen Betainaldehyd vermitteln soll, gibt es bisher keine erfolgreiche Reproduktion in anderen Arbeitsgruppen, obwohl dies mehrfach versucht wurde (Maliga, 2004, Dhingra & Koop, Review in Vorbereitung). Im Gegensatz zur Kern-Transformation steht für Plastiden-Transformation also nur eine eng begrenzte Zahl von Selektionsmarkern zu Verfügung.

Wie oben (s. III.3) bereits erwähnt, gelang es mittels Plastiden-Transformation beide *oriA* zu deletieren. In unabhängigen Linien konnte auch der *oriB2* in allen Plastom-Kopien deletiert werden, während der *oriB1*, der innerhalb des essentiellen *ycf1*-Gens liegt, nur heteroplastomisch deletiert werden konnte (Mühlbauer et al., 2002). Es konnte also noch nicht festgestellt werden, ob eine der beiden Kopien des *oriB* essentiell ist und ob *oriA* und *oriB* gleichzeitig deletiert werden können.

III.7. Zielsetzung

Diese Arbeit sollte die Frage klären, ob alle Kopien der *oriA* und *oriB* essentiell sind oder ob deren Deletion durch andere Replikationsursprünge und/oder Replikationsmechanismen kompensiert werden kann. Hierfür sollte einerseits versucht werden, *oriA* und *oriB* in einer Linie zu deletieren. Andererseits war vorgesehen, den *oriB1* zu inaktivieren, um zu testen, ob tatsächlich eine Kopie des *oriB*, wie in der Literatur beschrieben (Mühlbauer et al., 2002), essentiell ist. Da eine Deletion des *oriB1* nicht

möglich ist, weil dieser innerhalb der kodierenden Sequenz des essentiellen Gens *ycf1* liegt, sollte die DNA-Sekundärstruktur des *oriB1* bei Erhalt der Aminosäuresequenz von *ycf1* mutiert werden. Ein weiterer Teil des Projekts war die Untersuchung der Struktur der plastidären DNA in Hinblick auf die DNA-Replikation und auf eventuelle Rückschlüsse in Bezug auf die Nutzung der Replikationsursprünge. Deshalb wurde geplant, die Struktur der ptDNA des Wildtyps von *Nicotiana tabacum* mittels Pulsfeldgelelektrophorese mit der Struktur der ptDNA von Linien mit deletierten Replikationsursprüngen zu vergleichen. Zudem sollten die Enden von linearen ptDNA-Molekülen kartiert werden und überprüft werden, ob diese Enden wie in *Zea mays* (Oldenburg & Bendich, 2004a) mit Replikationsursprüngen korrelieren.

IV. Material und Methoden

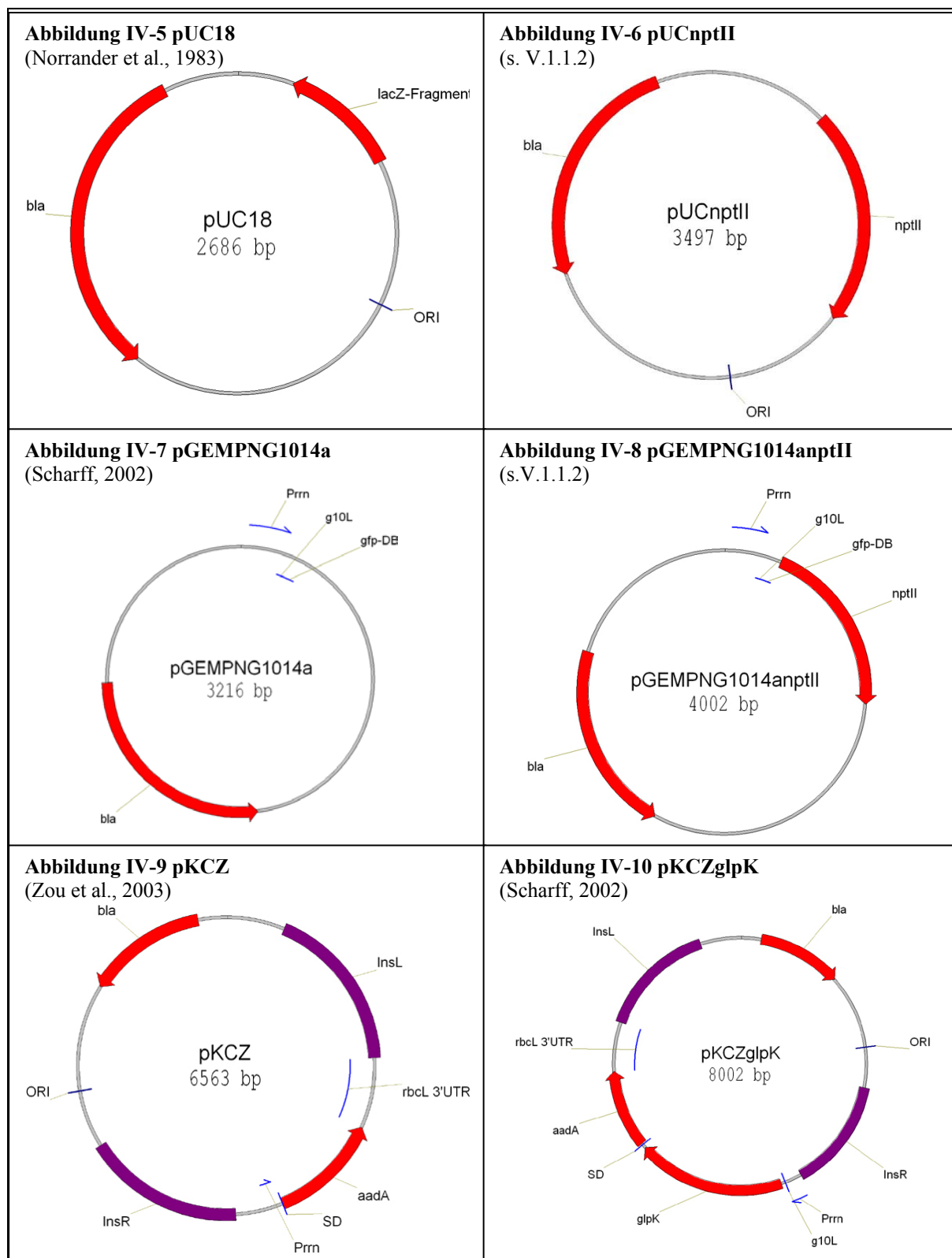
IV.1. Material

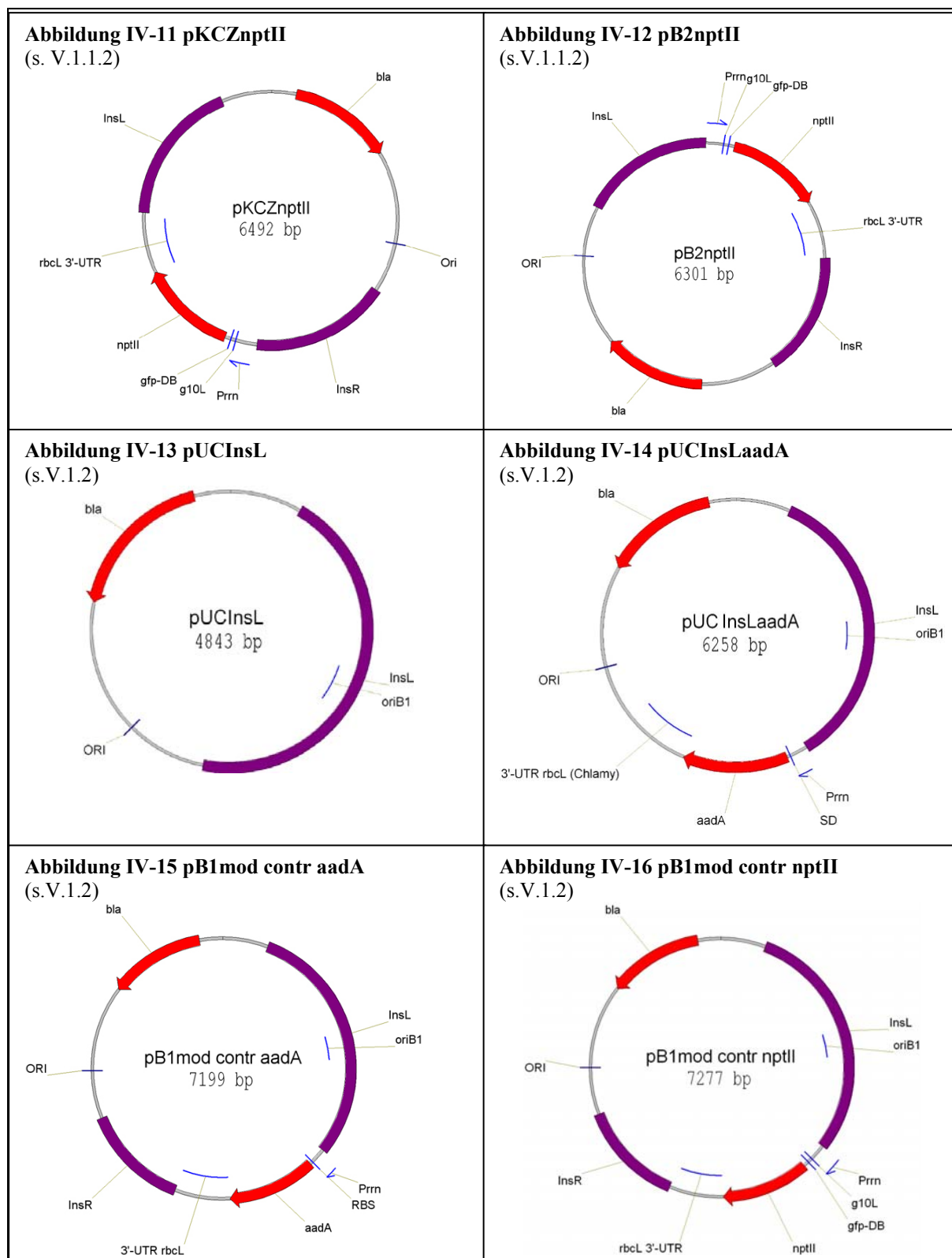
IV.1.1. Chemikalien

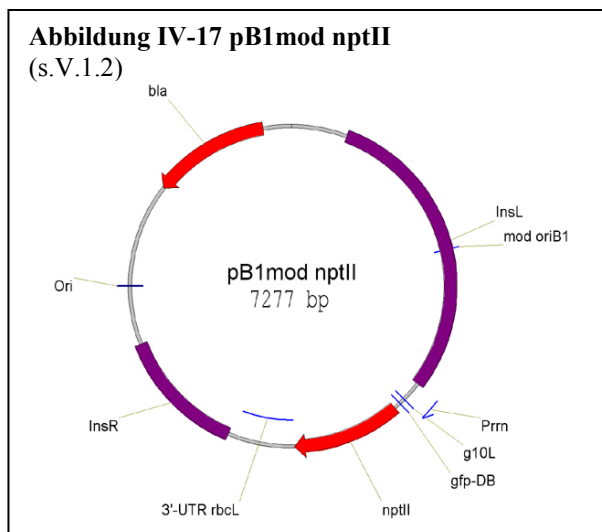
Standardchemikalien (anorganische Salze, Säuren, Zucker, organische Verbindungen, Lösungsmittel) wurden in p.a.-Qualität von folgenden Herstellern bezogen: GE Healthcare, München; MBI Fermentas, St. Leon-Rot; Merck, Darmstadt; Peqlab, Erlangen; Roth, Karlsruhe und Sigma-Aldrich, Taufkirchen. Das verwendete Wasser wurde mit einer Reinstwasseranlage aufgereinigt („Ultra Clear“, SG, Barsbüttel) und wenn notwendig, zusätzlich autoklaviert.

IV.1.2. Transformationsvektoren/Plasmide:









IV.1.3. Sonden

Tabelle IV-1: Sonden für den Nachweis transformierter Linien

Sonde	Position im Plastom	Hergestellt mittels PCR Quelle/Primer	Aus Plasmid ausgeschnitten
23S	108325-109255, 133371-134301	Aus WT-Tabak mit p186/p187	-
InsR	109230-110348, 132278-133396	-	Aus pKCZnptII mit EcoRI
InsL	111072-112020, 129556-131554	-	Aus pB1mod contr aadA mit XbaI
oriB1	111918-112020, 130044-130708	Aus pB1mod contr aadA mit p333/p334	-

Tabelle IV-2: Sonden für PFGE-Analysen

Sonde	Position im Plastom	Hergestellt mittels PCR Quelle/Primer	Plasmid
<i>ndhD</i>	117569-118713	Aus WT-Tabak mit p251/p252	
<i>rpoA</i>	80455-81468	Aus WT-Tabak mit p243/p244	
pTB7	18942-29830		Sugiura et al., 1986
pTB22	59314-64109		Sugiura et al., 1986
<i>ycf2</i>	89565-89862, 152764-153061	Aus WT-Tabak mit p372/p373	

IV.1.4. Primer

Tabelle IV-3: Primer

Nr.	Ort	Sequenz (5' → 3')
oSM129	<i>rrn16</i>	GCTGGCGGCATGCTTAACAC
p149	<i>aadA</i>	GGCGATAACCGCTTCACGAG
p151	3'-UTR <i>rbcL</i> (<i>Chlamy</i>)	CGGATGTAACCTCAATCGGTAG
p174	<i>ndhF</i>	TGGGGTCTTATCGAAGCG
p175	<i>ycf1</i>	TTGCGCAAAAGGAATGGTATC
p186	<i>rrn23</i>	TCTCGCCGTGACCTTCTCTTG
p187	<i>rrn23</i>	TCTGGGCACTGTCTCGGAGAGAG
p220	<i>modoriB1</i>	TCCGGATCCCATCTCTCCTCGCTGAATAAACTTGGTGATGG
p221	<i>modoriB1</i>	AGGGATCCACAGAGGAAGACCCTTACCCATCACCAAGTTTATTCAGC
p222	InsL (<i>ycf1</i>) plus <i>HindIII</i>	AAGCTTTGATGATCCAGTGGTACG TGATGATCCAGTGGTACG
p223	InsL (<i>ycf1</i>) plus <i>XhoI</i> , <i>SalI</i>	AGTCGACCTCGAGATTGACATAACAGATGTCGATTGACATAACAGATGTCG
p224	InsR (<i>orf75</i>) plus <i>KpnI</i>	AGGTACCTGAATGGAATTGGGATATGG
p225	InsR (<i>trnR</i>)	ACAGATCCAGTGGAGACG
p243	5' von <i>rpoA</i> plus <i>NcoI</i>	ATCCATGGTTCGAGAGAAAGTAAC
p244	3' von <i>rpoA</i> plus <i>PstI</i>	TACTGCAGTTAAAACCTATTTTTTGTAAATC
p249	5' von <i>nptIII</i> plus <i>NdeI</i>	ACATATGATTGAACAAGATGGATTGC
p250	3' von <i>nptIII</i> plus <i>PstI</i> und <i>SalI</i> , Stopcodon zu UAA modifiziert	GTCGACCTGCAGTTAGAAGAAGACTCGTCAAGAAG
p251	<i>ndhD</i> - Sonde	GCTAATGAAAGAACGAAATCCGGG
p252	<i>ndhD</i> - Sonde	TGGCCAGTTACTCGAGATTCTCG
p257	5' <i>rbcS</i> - Sonde	AGACTCTCTCATACTTCCTG
p258	3' <i>rbcS</i> - Sonde	ACTTGACGCACGTTGTCG
p259	5' <i>rbcL</i> - Sonde	TGAATGCTACTGCAGGTACATG
p260	3' <i>rbcL</i> - Sonde	ATCACGTCCTTCATTACGAGC
p316	<i>modoriB1</i> - Nachweis	AGGGCCCTCTTATCTCTTCCTTCTCCGAGCTC
p333	<i>oriB1</i> - Sonde	AGGATCATACATTTTAGGCACG
p334	<i>oriB1</i> - Sonde	AAGAAAGGTGGGATCCGG
p372	<i>ycf2</i> -Sonde	TTGGCGGAATTGCCAC
p373	<i>ycf2</i> -Sonde	CCGCAAGGACCATGAT

Die Oligonukleotide wurden von MWG, Ebersberg produziert.

IV.1.5. Antibiotika

Tabelle IV-4: Verwendete Antibiotika

Antibiotika	Gelöst in	Stocklösung	Bakterienkultur	Pflanzenkultur	Hersteller
Ampicillin	Wasser	10 mg/ml	75 µg/ml	-	Serva, Heidelberg
Kanamycin	Wasser	15 mg/ml	50 µg/ml	25-50 µg/ml	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Spectinomycin	Wasser	100 mg/ml	100 µg/ml	500 µg/ml	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Streptomycin	Wasser	50 mg/ml	100 µg/ml	500 µg/ml	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

IV.1.6. Bakterienstämme

Sure

E. coli K-12, Kanamycin- und Tetracyclin-resistent, $e14^-$ (*McrA*⁻) Δ (*mcrCB-hsdSMR-mrr*)171 *endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 lac recB recJ sbcC umuC::Tn5* (Kan^r) *uvrC* [F' *proAB lacI^qZΔM15 Tn10* (Tet^r)]. Ein DNA-Klonierungsstamm, dessen Rekombinations-, UV-Reparatur- und SOS-Reparatursystem, sowie mehrere Endonukleasen deletiert wurden (Stratagene, La Jolla, USA).

JM110

E. coli K-12, Streptomycin-resistent, *rpsL* (Str^r) *thr leu thi-1 lacY galK galT ara tonA tsx dam dcm supE44 Δ(lac-proAB)* [F' *traD36 proAB lacI^qZΔM15*]. Ein DNA-Klonierungsstamm, der nicht in der Lage ist, DNA zu methylieren (Stratagene, La Jolla, USA).

DH5α

E. coli, F⁻φ 80*lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)* U169 *recA1 endA1 hsdR17*(r_k⁻, m_k⁺) *phoA supE44 λ⁻ thi-1 gyrA96 relA1*. Ein weit verbreiteter DNA-Klonierungsstamm (Invitrogen Life Technologies, Groningen, Niederlande).

IV.1.7. Enzyme

DNA modifizierende Enzyme und DNA-Polymerasen wurden von MBI-Fermentas, St. Leon-Rot; New England Biolabs (Frankfurt/Main) und Promega (Mannheim) gekauft.

IV.1.8. DNA-Längenstandards

λ *Eco*47I DNA Marker

λ *Eco*RI DNA Marker

λ *Eco*130I/*Mlu*I DNA Marker

λ *Hind*III DNA Marker

GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder

GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder

GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder

Super coiled DNA Ladder 2-10 kb

Alle Marker wurden von MBI-Fermentas, St. Leon-Rot produziert.

IV.1.9. Molekularbiologische "kits"

HiSpeed™ Plasmid Midi Kit

Qiagen, Hilden

MinElute Gel Extraction Kit

Qiagen, Hilden

MinElute PCR Purification Kit

Qiagen, Hilden

pGEM®-T Easy Vector Systems

Promega, Mannheim

prime-a-gene labelling system

Promega, Mannheim

QIAGEN Plasmid Maxi Kit

Qiagen, Hilden

Qiaprep Spin Miniprep Kit

Qiagen, Hilden

QIAquick Gel Extraction Kit

Qiagen, Hilden

QIAquick PCR Purification Kit

Qiagen, Hilden

T4 DNA Ligase (with PEG)

MBI Fermentas, St. Leon-Rot

IV.1.10. Verbrauchsmaterial

Im Folgenden sind nur Verbrauchsmaterialien erwähnt, die von der üblichen Laborausstattung abweichen:

Elektroporationsküvetten 2 mm	Peqlab, Erlangen
Gewebekultur-Petrischalen, steril (Ø 6 cm)	Sarstedt, Nümbrecht
Gewebekultur-Petrischalen, steril (Ø 9 cm)	Renner, Dannstadt
Gewebekultur-Röhrchen, steril, 12 ml	Greiner, Solingen
N+-Nylonmembran	Amersham, Freiburg
Polypropylen-Kulturröhrchen 2059	Falcon, Lincoln Park, NJ (USA)

IV.1.11. Geräte

Absaugpumpe VacuGene Pump	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
ActionCam	AGFA, Köln
Analysenwaage Analytic AC 120 S	Satorius, Göttingen
Autoklav Aesculap 420	Aesculap-Werke, Tuttlingen
Autoklav Varioklav 500 EV	H+P Labortechnik, München
Elektrophorese-Spannungsversorgung 2301 Makrodrive	LKB Produkter, Bromma, Schweden
Elektrophorese-Spannungsversorgung Modell 100/200	Bio-Rad, München
Elektroporationsgerät Easyject Plus	Equibio, Ashford, UK
Geldokumentationssystem	MWG Biotech, Ebersberg
Gelelektrophoresekammer Easy-Cast B3	Owl Scientific, Woburn, USA
Gelelektrophoresekammer GNA 200	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Gelelektrophorese-Photosystem QuickShooter QSP	Kodak IBI, New Haven, CT, USA
Klimaschrank Rumed Nr. 1200	Rubarth Apparate, Hannover
particle-gun PDS-1000/He	Bio-Rad, München
PCR Express Thermal Cycler	Hybaid, Ashford, UK
pH-Meter Meßgerät WTW pH522	WTW, Weilheim
Sicherheits-Sterilbank UVF6.12S	BDK Luft- und Reinraumtechnik, Sonnenbühl-Genkingen
Sterilbank Microflor	Stalco, Düsseldorf
Thermoblock 5320	Eppendorf, Hamburg
UV-Crosslinker	Amersham, Freiburg
Vacuum Concentrator	Bachofer, Reutlingen
„Vortex“ Genie 2 Modell 6560E	Scientific Ind., Bohemia, NY, USA
Waage Typ 2255	Sartorius, Göttingen
Wasserbad	Wagner + Munz, München
Zentrifuge Sorvall RC-5B, Rotor SS34, GSA	DuPont Instruments, Bad Homburg
Zentrifuge Z323K	Hermle, Wehingen
Zentrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Universal 30 RF	Hettich, Tuttlingen

IV.1.12. Software

Sequenzvergleiche:

Blast 2 (NCBI, ‚National Center for Biotechnology Information‘)

URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html>

Sekundärstruktur:

ViennaRNA-1.5

URL: <http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>

Vektorprogramm:

Vector NTI deluxe Version 4.0.2 (Informax)

Geldokumentation:

OneDScan (MWG-Biotech, Ebersberg)

Phosphoimager-Auswertung:

Tina 2.0 (Raytest)

Bildverarbeitung und Grafik:

Photoshop 5.0 (Adobe), MS Powerpoint 2003 (Microsoft)

Textverarbeitung und -auswertung:

MS Word 2003 (Microsoft), MS Excel 2003 (Microsoft)

Suchmaschinen:

<http://www.google.de>,

<http://scholar.google.de/>,

<http://www.scirus.com/srsapp/>,

<http://www.scopus.com/scopus/home.url>

IV.1.13. Datenbanken

Literaturdatenbank:

Pubmed (NCBI), URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/>

Elektronische Zeitschriften:

Universitätsbibliothek München (LMU), URL:

<http://rzblx1.uni-regensburg.de/ezeit/fl.phtml?notation=W&bibid=UBM&colors=7&frames=&toc=&ssg=>

Sequenzdatenbank:

NCBI, URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide>

Plastiden-Genome: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/ORGANELLES/plastids_tax.html

IV.1.14. Medien

IV.1.14.1. Protoplasten

Enzymlösung

1 g Cellulase R10 bzw. Macerase R10 wurden in ein Becherglas eingewogen, 10 ml autoklaviertes, ultrafiltriertes Wasser zugegeben und bis zur Lösung gerührt. Zu 10 ml Enzymlösung wurden 1,37 g Saccharose zugegeben und 5 – 10 min bei maximaler Umdrehungszahl in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde sterilfiltriert und in 10 ml Aliquots eingefroren.

10 % Cellulaselösung

Cellulase R10	100 g/l
Saccharose	137 g/l

10 % Maceraselösung

Mazerozym R10	100 g/l
Saccharose	137 g/l

Protoplasten-Isolierungsmedien

Protoplastenisolierungs- und Kulturmedien durften nicht autoklaviert werden sondern mussten sterilfiltriert werden (durch 0,2 µm Filter). Nach der Sterilfiltration wurden die Medien aliquotiert (ca. 50 ml Aliquots).

F-PCN Fast Protoplast Culture Medium Nicotiana (Dovzhenko et al., 1998)

Macro MS-modified:

KNO ₃ (10 mM)	1012 mg	
CaCl ₂ x 2H ₂ O	440 mg	
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	370 mg	
KH ₂ PO ₄	170 mg	
NH ₄ -Succinat (20mM), s.u.	10 ml	
Micro MS	10 ml	
PC-Vitamine	10 ml	
Polypuffer	10 ml	
BAP (6-Benzylamino-Purin; 1 mg/ml)	1 ml	
NAA (α-Naphtyl-Essigsäure; 1 mg/ml)	0,1 ml	
Saccharose	20 g	
Glucose	~ 65 g	(550 mOsm)
pH 5,8 (KOH)		

Auf 1 l mit ultrafiltriertem, autoklaviertem dH₂O auffüllen. Sterilfiltrieren mit 0,2 µm-Filter.

F-PIN Fast Protoplast Isolation Medium Nicotiana (Dovzhenko et al., 1998)

Macro MS-modified und alle Salze wie F-PCN, aber
anstatt von Glucose und Saccharose nur

Saccharose (ultrapur)	~ 130 g	(550 mOsm)
pH 5,8 (KOH)		

Auf 1 l mit ultrafiltriertem, autoklaviertem dH₂O auffüllen. 0,2 µm-Sterilfiltrieren.

2 M Ammoniumsuccinat (Dovzhenko et al., 1998)

Bernsteinsäure (Succinat)	23,6 g
NH ₄ Cl	10,6 g
KOH-Plätzchen	~ 22,4 g
pH 5,8	

Auf 1 l mit ultrafiltriertem, autoklaviertem dH₂O auffüllen. Sterilfiltrieren mit 0,2 µm-Filter.

MMM MES-Magnesium Mannit (Dovzhenko et al., 1998):

MES	1952 mg
MgSO ₄ x 7H ₂ O	1250 mg
MgCl ₂ x 6H ₂ O	1020 mg
Mannitol	~85 g

pH 5,8 (KOH)
550 mOsm

Auf 1 l mit ultrafiltriertem, autoklaviertem dH₂O auffüllen. Sterilfiltrieren mit 0,2 µm-Filter.

IV.1.14.2. Pflanzenkultur**RMOP (Svab et al., 1990)**

MS-Salze	4,4 g
NT-Vitamine	10,0 ml
BAP [1 mg/ml]	1,0 ml
NAA [1 mg/ml]	0,1 ml
Saccharose	30,0 g

Auf 1 l mit Wasser auffüllen, pH 5,8 mit 1 M KOH einstellen
Für Festmedium: vor dem Autoklavieren 8 g/l Agar zugeben.

B₅mod (Dovzhenko et al., 1998)

B ₅ -Salze	3,1 g
B ₅ -Vitamine	10 ml
MgSO ₄ *7 H ₂ O	0,983 g
Saccharose	20 g

Auf 1 l mit Wasser auffüllen, pH 5,8 mit 1 M KOH einstellen
Für Festmedium: vor dem Autoklavieren 8 g/l Agar zugeben.

B₅-Salze (Gamborg et al., 1968)

KNO ₃	2500
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	150
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	250
NaH ₂ PO ₄ · 2 H ₂ O	150
(NH ₄)SO ₄	134
Fe(III)-EDTA	40
KJ	0,75
H ₃ BO ₃	3,00
MnSO ₄ · H ₂ O	10,00
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	2,00
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	0,25
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0,025
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	0,025

Angaben in mg/l

MS-Salze (Murashige & Skoog, 1962):

NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	440
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
Fe(III)-EDTA	40
KJ	0,83
H ₃ BO ₃	6,20
MnSO ₄ · H ₂ O	22,3
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	8,60
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	0,25
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0,025
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	0,025

Angaben in mg/l

B₅-Vitamine (Gamborg et al., 1968):

Inosit	100 mg/l
Pyridoxin-HCl	1 mg/l
Thiamin-HCl	10 mg/l
Nicotinsäure	1 mg/l

MS-Vitamine (Murashige & Skoog, 1962):

Inosit	100,0 mg/l
Pyridoxin-HCl	0,5 mg/l
Thiamin-HCl	0,1 mg/l
Glycin	2,0 mg/l
Nicotinsäure	0,5 mg/l

NT-Vitamine (Nagata & Takebe, 1971):

Inosit	100 mg/l
Thiamin-HCl	1 mg/l

PC-Vitamine (Koop & Schweiger, 1985):

Inosit	200 mg/l
Pyridoxin-HCl	2 mg/l
Biotin	20 µg/ml
Ca-Panthotenat	2 mg/ml
Nicotinsäure	2 mg/ml

IV.1.14.3. Bakterien**SOC:**

Pepton	20 g
Hefe-Extrakt	5 g
NaCl	0,5 g

Auf 1 l mit Wasser auffüllen, pH 7 mit 1 M KOH einstellen.
Autoklavieren.

Danach zugeben (getrennt autoklavieren):

KCl [1 M]	2,4 ml
MgCl ₂ [2 M]	20 ml
Glucose [2 M]	10 ml

LB:

Pepton	10 g
Hefe-Extrakt	5 g
NaCl	10 g

Auf 1 l mit Wasser auffüllen, pH 7 mit 1 M KOH einstellen
Autoklavieren

IV.2. Methoden

IV.2.1. Molekularbiologische Methoden

IV.2.1.1. DNA-Isolation aus Bakterien

Gesamt-DNA aus Bakterien wurde aus einer 4 ml LB-Kultur (s. IV.1.12.3) isoliert, die mit einer Kolonie angeimpft und ca. 16 h bei 37°C mit 250 upm geschüttelt worden war. Durch 5 Minuten Zentrifugation mit 10.000 g erfolgte das Ernten der Bakterien. Das Bakterienpellet wurde in 250 µl Extraktionspuffer resuspendiert. Nach einer Stunde Lyse der Bakterien bei 56°C und anschließender Zugabe von 250 µl Chloroform zum Abtrennen von Proteinen, war eine Inkubation von 30 Minuten auf einem Über-Kopf-Schüttler und eine Abtrennung der Chloroform-Phase durch 10 Minuten Zentrifugation bei 10.000 g notwendig. Die abgenommene wässrige Phase ohne Interphase wurde durch Zugabe von 0,7 Volumen Isopropanol (100%), 20 Minuten Inkubation bei -20°C und 10 Minuten Zentrifugation bei 21.000 g gefällt. Danach erfolgte ein Waschen des Pellets mit 1 ml Ethanol (70%), eine erneute Zentrifugation von 5 Minuten bei 21.000 g, die Trocknung des Pellets an der Luft (maximal 5 Minuten) und die Resuspendierung in 80 µl TE-Puffer.

Extraktionspuffer:

Tris/HCl pH 7,5	50 mM
SDS	0,5%
NaCl	10 mM
EDTA	50 mM

TE-Puffer:

Tris/HCl (pH 8)	10 mM
EDTA	1 mM

EB-Puffer:

Tris/HCl (pH 8)	10 mM
-----------------	-------

IV.2.1.2. DNA-Isolation aus Pflanzen

Die DNA-Isolation aus Blättern oder Kallusgewebe wurde modifiziert nach Murray & Thompson (1980) durchgeführt. Das Pflanzenmaterial wurde in flüssigem Stickstoff gemörsert. Alternativ wurde es in flüssigem Stickstoff gefroren, dann mit der Lyophilie Micro Modulyo 230 (Thermo, Dreieich) zwei Tage gefriergetrocknet, anschließend

Glaskugeln zugeben und mit der Schwingmühle MM 200 (Retsch, Haan) das Material homogenisiert. Die Gefriertrocknung ist besonders bei kallösem Material und einer hohen Probenzahl vorteilhaft, da das Material besser und mit geringerem Arbeitsaufwand homogenisiert werden kann. Die Lyse des Homogenisats fand in 1 Volumen 2x CTAB-Extraktionspuffer bzw. 1 Volumen 1x CTAB-Extraktionspuffer bei gefriertrocknetem Material für eine Stunde bei 60°C statt. Durch Zugabe von 1 Volumen Chloroform erfolgte eine Abtrennung der Proteine durch 30 Minuten Inkubation auf einem Über-Kopf-Schüttler. Die Chloroform-Phase wurde durch 5 Minuten Zentrifugation bei 10.000 g abgetrennt. Um die RNA zu entfernen, wurden 5 µl RNase A [10 µg/ml] zugeben, der Ansatz für 30 Minuten bei 42°C inkubiert und dann der Chloroform-Schritt wiederholt. Die DNA konnte durch Zugabe von 0,7 Volumen Isopropanol (100 %) abgetrennt werden. Dafür erfolgte eine Inkubation von 30 Minuten bei -20°C und eine anschließende Zentrifugation von 10 Minuten und 21.000 g. Nach Waschen des Pellets in Ethanol (70%) und erneuter Zentrifugation (nur 5 Minuten) konnte die DNA getrocknet und in 50 - 100 µl EB- oder TE-Puffer gelöst werden.

2x CTAB-Extraktionspuffer

Tris-HCl (pH 8)	200 mM	
CTAB	2% (w/v)	
EDTA	20 mM	
NaCl	1400 mM	
PVP (40 kDa)	1% (w/v)	
β-Mercaptoethanol	280 mM	(frisch zugeben)

IV.2.1.3. Plasmid-Isolation aus Bakterien

Für die Plasmid-DNA-Isolation aus Bakterien wurde für die Klonierung der ‚Qiaprep® Spin Miniprep Kit‘ (Qiagen, Hilden) verwendet. Dieser beruht auf der alkalischen Lyse nach Birnboim & Doly (1979) und einer anschließenden Aufreinigung über einen Ionenaustauscher. Es ist möglich, bis zu 20 µg Plasmid-DNA zu isolieren. Für die Überprüfung der Ligationsprodukte wurde statt der Aufreinigung über einen Ionenaustauscher eine alkoholische Fällung mit 0,7 Volumen Isopropanol (100%) und anschließendem Waschen mit 70% Ethanol verwendet. Für größere Plasmidmengen für die Plasmid-Transformation mit der biolistischen Methode wurde der ‚HiSpeed™ Plasmid Midi Kit‘ (Qiagen, Hilden, bis 200 µg Plasmid-DNA) oder ‚Qiagen Plasmid Maxi Kit‘ (Qiagen, Hilden, bis 500 µg Plasmid-DNA) genutzt. Diese beruhen auf den gleichen Prinzipien wie der ‚Qiaprep® Spin Miniprep Kit‘ (Qiagen, Hil-

den), nur ist nach der Aufreinigung über einen Ionenaustauscher noch eine Isopropanol-Fällung notwendig, um eine Aufkonzentrierung der DNA zu erreichen. Je nach Verwendung kann die DNA in Wasser bei -20°C gelagert oder in TE oder EB gelöst bei 4°C gelagert werden.

IV.2.1.4. DNA-Aufreinigung

Für DNA-Aufreinigungen wurden der ‚MinElute-Kit‘ und der ‚QIAquick-Kit‘ von Qiagen (Hilden) verwendet. Deren Prinzip besteht aus einem Ionenaustauscher, der in Hochsalzbedingungen DNA bindet, während unter Niedrigsalzbedingungen DNA eluiert wird. Mit diesen ‚Kits‘ ist es möglich, Pufferwechsel vorzunehmen, DNA aus Agarose-Gelen zu extrahieren oder Enzyme, Primer und Salze zu entfernen. Mit dem ersten ‚Kit‘ ist es möglich mit 10 μl zu eluieren und so geringe DNA-Mengen aufzukonzentrieren. Allerdings ist nur ein Eluieren von Fragmenten bis 4 kb empfohlen. Bei den QIAquick-Kits ist das Eluieren mit 30 – 50 μl und von Fragmenten bis 10 kb möglich.

Alternativ zu den Kits wurde eine Alkoholfällung verwendet. Diese erfolgte entweder mit 0,7 Volumen Isopropanol (100%) oder mit 2,5 Volumen Ethanol (100%) und 0,1 Volumen Na-Acetat pH 5,2. Die Inkubation wurde entweder 20 – 30 Minuten bei Raumtemperatur (weniger Salze) oder bei -20°C (höhere Ausbeute) durchgeführt. Anschließend war eine Zentrifugation von 10 – 30 Minuten bei 21.000 g, ein Waschen des Pellets mit 1 ml Ethanol (70%) und eine erneute Zentrifugation von 5 Minuten bei 21.000 g notwendig. Das DNA-Pellet wurde kurz getrocknet und im gewünschten Puffer oder Wasser gelöst.

IV.2.1.5. Elektrophorese

Für die Auftrennung von DNA-Fragmenten wurde die Agarose-Gelelektrophorese verwendet. Agarose (Seakam LE Agarose, FMC BioProducts, Rockland, Maine, USA) wurde in TBE-Puffer kurz aufgekocht und nach dem Abkühlen auf ca. $40 - 50^{\circ}\text{C}$ wurde Ethidiumbromid (0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Gel) zugegeben. Dieses diente zur Anfärbung der DNA. Das Gel wurde in einen Gelschlitten mit Kamm gegossen. Nachdem das Gel ausgegärt war, wurde es in eine Gelkammer gesetzt und diese mit Laufpuffer (TBE) aufgefüllt. Je nach Gelkammer (Größe, mit oder ohne Umwälzvorrichtung) können verschiedene Spannungen verwendet werden (40 bis 120 V). Die Agarose-Konzentration wurde nach der Länge der aufzutrennenden Fragmente nach Angabe

des Herstellers gewählt. Bei den meisten Fragmentgrößen wurde 0,8% (w/v) verwendet, bei Fragmenten bis 400 bp 2%. Die DNA wurde mit 6x Auftragspuffer versetzt in die Geltaschen pipettiert.

TBE-Puffer:

Tris	89 mM
Borsäure	89 mM
EDTA	2 mM

6x Auftragspuffer:

Glycerin	30% (v/v)
EDTA	0,12 M
Bromphenolblau	0,25% (w/v)
Xylencyanol	0,25% (w/v)

IV.2.1.6. Bestimmung der DNA-Konzentration

Die DNA wurde mit 6x Auftragspuffer versetzt auf ein Gel aufgetragen, optional auch in verschiedenen Verdünnungen. Als Vergleich dienten 10 µl λ *Hind*III-Marker, der eine 22 ng-, 24 ng-, 69 ng-, 100 ng- und eine 240 ng-Bande enthält. Das Gel wurde mit dem Geldokumentationssystem (MWG, Ebersberg) photographiert, die Datei als *.tif-Datei abgespeichert und für die Auswertung OneDScan (MWG, Ebersberg) verwendet.

IV.2.1.7. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

PCR wurde für den Nachweis von Genen und die Amplifikation von Sequenzen für die Klonierung verwendet. Es wurden auch synthetische Sequenzen durch die Kombination von überlappenden Primern produziert. Die Primer müssen so konzipiert werden, dass eine stringente Selektion auf die Basenpaarung zwischen Ziel-DNA und Primer möglich ist. Die Spezifität (Stringenz) der Reaktion wird durch die Wahl der Temperatur, bei der die Primer an die gewünschte Sequenz binden, beeinflusst. Die Temperatur muss hoch genug sein, um unspezifische Wechselwirkungen auszuschalten. Die Schmelztemperatur (T_m) des Primer-Matrize-Hybrids kann mit folgenden Formeln berechnet oder alternativ von Programmen, wie Vektor NTI, berechnet werden.

$$T_m [^{\circ}\text{C}] = [4 \times (\text{G} + \text{C})] + [2 \times (\text{A} + \text{T})]$$

$$T_m [^{\circ}\text{C}] = 69,3 + (0,41 \times [\%GC] - 650/\text{L\u00e4nge des Primers})$$

F\u00fcr die Temperatur ist die L\u00e4nge des Primers (optimal um 20 bp) und der GC-Gehalt (> 40%) entscheidend. Die Stringenz kann durch 3'-Enden, deren letzten beiden Nukleotide aus G-C-Paaren bestehen, erh\u00f6ht werden. Komplement\u00e4re Bereiche innerhalb eines Primers oder eines Primerpaars sollten zur Verhinderung von Sekund\u00e4rstrukturen bzw. der Bildung von Primer-Dimeren vermieden werden. F\u00fcr die Hybridisierung (*annealing*) wird eine Temperatur 5\u00b0C unter der T_m gew\u00e4hlt (= T_a). Die Stringenz h\u00e4ngt neben den Primern und der Hybridisierungstemperatur noch von der Ionenkonzentration, insbesondere der MgCl_2 -Menge, und dem pH-Wert ab, die beide so gew\u00e4hlt werden m\u00fcssen, dass unspezifische Wechselwirkungen minimiert werden.

Die DNA-Menge wird nach dem Anteil der Ziel-DNA gew\u00e4hlt. Dabei ist auch darauf zu achten, dass zu hohe DNA-Konzentrationen die Reaktion negativ beeinflussen. Folgende Konzentrationen wurden verwendet:

- Plasmide 1 ng (auch weniger m\u00f6glich)
- Plastom 20 – 40 ng (Gesamt-DNA)
- Bakterien-Genom 50 – 60 ng (Gesamt-DNA)
- Genom 100 – 300 ng (Gesamt-DNA)

F\u00fcr die Nachweis-Reaktionen wurde die Taq-Polymerase (Qiagen, Hilden; New England Biolabs, Frankfurt/Main), f\u00fcr die Klonierung Phusion-Polymerase (New England Biolabs, Frankfurt/Main) verwendet. Die Taq-Polymerase hat eine Fehlerh\u00e4ufigkeit von $2,2 \times 10^{-5}$ pro Zyklus, die Phusion-Polymerase von $4,4 \times 10^{-7}$ pro Zyklus.

Ein PCR-Reaktionsgemisch bestand bei der Nutzung der Taq-Polymerase aus den folgenden Komponenten:

DNA	je nach H\u00e4ufigkeit der zu amplifizierenden Sequenz (s.o.)
5'-Primer (<i>forward</i>)	0,2 μM
3'-Primer (<i>reverse</i>)	0,2 μM
10x Puffer	1/10 Volumen
dNTPs	200 μM pro Nukleotid
DNA-Polymerase (Taq)	0,625 u
Mit Wasser bidest. auf 25 μl auff\u00fcllen.	

Ein PCR-Reaktionsgemisch bestand bei der Nutzung der Phusion-Polymerase aus den folgenden Komponenten:

DNA	je nach Häufigkeit der zu amplifizierenden Sequenz (s.o.)
5'-Primer (<i>forward</i>)	0,2 µM
3'-Primer (<i>reverse</i>)	0,2 µM
5x Puffer	1/5 Volumen
dNTPs	200 µM pro Nukleotid
DNA-Polymerase (Phusion)	1 u
Mit Wasser bidest. auf 50 µl auffüllen.	

Ein PCR-Programm für die Taq-Polymerase war folgendermaßen aufgebaut:

- | | | |
|-----------------|-------------------------------------|---|
| a) 1 Zyklus | Denaturierung | 2 Minuten bei 94°C |
| b) 30-40 Zyklen | Denaturierung | 45 Sekunden bei 94°C (über 2 kb: 1 min) |
| | Hybridisierung (<i>annealing</i>) | 45 Sekunden bei T _a |
| | Synthese | 1 Minute/kb bei 72°C |
| c) 1 Zyklus | Synthese | 5 Minuten bei 72°C (Auffüll-Reaktion) |

Ein PCR-Programm für die Phusion-Polymerase war folgendermaßen aufgebaut:

- | | | |
|--------------|-------------------------------------|---------------------------------------|
| a) 1 Zyklus | Denaturierung | 30 Sekunden bei 98°C |
| b) 30 Zyklen | Denaturierung | 10 Sekunden bei 98°C |
| | Hybridisierung (<i>annealing</i>) | 30 Sekunden bei T _a |
| | Synthese | 30 Sekunden/kb bei 72°C |
| c) 1 Zyklus | Synthese | 5 Minuten bei 72°C (Auffüll-Reaktion) |

Alle PCR-Reaktionen wurden in einem PCR-Express-Block der Firma Hybaid (Heidelberg) durchgeführt.

IV.2.1.8. Restriktionsenzyme

Restriktionsenzyme wurden für die Klonierung und für die Analyse von Vektoren und Transformanten (s. III.2.3.5) verwendet. Bei der Klonierung ist auf die Art der Schnittstelle zu achten: überhängende Enden (klebrig, *sticky ends*) oder glatte Enden (*blunt ends*). Erstere erlauben eine Kontrolle der Orientierung der eingefügten Sequenz bei Verwendung von zwei verschiedenen Enzymen und ermöglichen zudem eine effizientere Ligation. Die eingesetzte Enzymkonzentration war 1 u Enzym pro µg DNA und Stunde. Die Enzyme werden in Puffern mit 50% Glycerin gelagert. Es ist darauf zu achten, dass die Glycerinkonzentration im gesamten Reaktionsansatz nicht 5% überschreitet, da sonst die Reaktion gehemmt wird. Für die optimale Aktivität werden

für das Enzym vom Hersteller spezifische Puffer geliefert, zu denen teilweise noch BSA hinzugefügt werden muss.

IV.2.1.9. Modifikation der DNA

Herstellung von glatten Enden (blunt ends)

Teilweise ist es notwendig, ein überhängendes Ende nach dem Schneiden mit einem Restriktionsenzym zu entfernen. Dies geschieht – je nach Überhang – durch Auffüllen durch eine DNA-Polymerase oder die Entfernung des überhängenden Endes durch eine 3'→5'-Exonukleaseaktivität. Das Klenow-Fragment (großes Fragment der DNA-Polymerase I aus *E. coli*) zeigt beide enzymatische Aktivitäten, die normalerweise bei der DNA-Polymerase I vorhandene 5'→3'-Exonukleaseaktivität fehlt. Allerdings zeigt die T4-DNA-Polymerase eine erhöhte 3'→5'-Exonukleaseaktivität, weshalb sie für diese Funktion besser als das Klenow-Fragment geeignet ist.

Anhängen von dATP oder dTTP (A-, T-tailing)

Um die Effizienz bei Ligationen mit glatten Enden zu erhöhen, ist es möglich, bei dem Plasmid dTTP und bei der inserierten Sequenz dATP anzuhängen, wodurch ‚klebrige‘ Enden entstehen. Für diese Reaktion wird die Fähigkeit der Taq-Polymerase ausgenutzt am 3'-Ende einzelne Nukleotide anzuhängen.

DNA	je nach Bedarf
10x Puffer	1/10 Volumen
dATP bzw. dTTP	0,32 mM
Taq-Polymerase	5 u/µg DNA

Dephosphorylierung

Um die Religation (Zirkularisierung) des Vektors zu verhindern, können die Phosphatreste am 5'-Ende durch eine Phosphatase entfernt werden. Hierfür wurde die CIAP (*calf intestine alkaline phosphatase*, Fermentas, St. Leon-Rot) aus *Bos taurus taurus* verwendet.

DNA	nach Bedarf
10x Puffer	1/10 Volumen
CIAP	1 u

IV.2.1.10. Ligationen

Ligationen wurden mit der T4-DNA-Ligase (MBI-Fermentas, St. Leon-Rot) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte für

eine Stunde bei 22°C oder über Nacht bei 4°C. Ein molekulares Verhältnis zwischen eingefügter DNA und Plasmid von 3:1 wurde eingesetzt. Für die Transformation von Bakterien durch Elektroporation empfiehlt sich eine Aufreinigung mit dem ‚QIAquick PCR Purification Kit‘ (Qiagen, Hilden), die Eluation erfolgte mit 30 – 50 µl Wasser. Von dem Eluat wurden 5 – 15 µl für die Transformation verwendet. Wegen der schlechteren Ausbeute bei Ligationen mit glatten Enden (*blunt ligation*) ist eine höhere DNA-Menge für die Transformation notwendig. Für die Verbesserung der Ausbeute können durch Anhängen von dTTP bzw. dATP vor der Ligation klebrige Enden erzeugt werden.

IV.2.1.11. Herstellung kompetenter Zellen

Elektrokompetente Zellen

Für die Elektroporation ist für eine optimale Effizienz das Entfernen der Salze notwendig. Alle verwendeten Bakterienstämme erwiesen sich als geeignet.

Mit je einer Kolonie von einer Platte wurden 4 ml LB-Kulturen (s. IV.1.14.3, mit Antibiotika zur Selektion des Stammes, s. IV.1.6) angeimpft und diese ca. 16 h (über Nacht) bei 37°C und 250 upm inkubiert. Mit einer Vorkultur wurden 250 ml LB angeimpft und diese bei 37°C und 250 upm bis zu einer OD_{600nm} von 0,5 wachsen gelassen. Nach 15 Minuten Zentrifugation in GSA-Zentrifugenbechern mit 4000 g, wurde das Medium abgenommen, die Zellen in 100 ml Wasser resuspendiert und wie oben erneut zentrifugiert. Dieser Schritt wurde noch einmal wiederholt und anschließend erfolgte die Resuspendierung der Bakterien in 20% Glycerin, wobei die Bakterienpellets mit wenig Wasser vereinigt und mit 50% Glycerin auf 20% Glycerin eingestellt wurden. Die Lagerung der Bakterien erfolgte bei –80°C nach Einfrieren in flüssigen Stickstoff. Alle Schritte wurden auf Eis mit vorgekühlten Lösungen durchgeführt.

Ultrakompetente Zellen

Mit einer Kolonie von einer LB-Platte (s. IV.1.14.3) wurden 25 ml SOB-Medium (s. IV.1.14.3) angeimpft und für sechs bis acht Stunden bei 37°C und 250 upm geschüttelt. Mit 5 ml wurden 250 ml SOB-Medium in einem 1 l-Kolben angeimpft und bei 18°C für 16 Stunden geschüttelt. Die Kultur wurde so lange wachsen gelassen, bis die OD_{600 nm} 0,55 erreichte. Danach wurde die Kultur 10 Minuten auf Eis gekühlt, worauf die Ernte der Kultur durch Zentrifugation bei 2500 g für 10 Minuten bei 4°C erfolgte. Das SOB-Medium wurde vollständig abgenommen und die Zellen wurden in

80 ml eis-gekühltem Inoue-Transformationspuffer resuspendiert, worauf erneut eine Zentrifugation bei 2500 g für 10 Minuten bei 4°C folgte. Die Zellen wurden vorsichtig in 20 ml eisgekühltem Inoue-Transformationspuffer resuspendiert und 1,5 ml DMSO hinzugefügt. Die Zellen wurden 10 Minuten auf Eis inkubiert und 50 µl-Aliquots hergestellt. Die Lagerung der Bakterien erfolgte bei –80°C nach Einfrieren in flüssigen Stickstoff.

IV.2.1.12. Transformation von Bakterien

Elektroporation

50 µl elektro-kompetente *E. coli*-Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und mit 1 bis 5 ng des Plasmids (optimal in H₂O gelöst) vorsichtig gemischt. Nach einer Minute wurden die Zellen in eine vorgekühlte Elektroporations-Küvette pipettiert (Spitzen mit weiter Öffnung) und sofort der Impuls (2500 V, 25 µF, 201 Ohm, 5 msec) gestartet. Die Zellen wurden mit 1 ml SOC-Medium (s. IV.1.14.3) aus der Küvette gespült und in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt (Spitze mit weiter Öffnung). Nach einer Stunde Schütteln bei 37°C und 200 upm konnten die Zellen optional eine Minute bei 4000 g zentrifugiert werden, um eine Aufkonzentrierung zu ermöglichen. In diesem Fall wurden 900 µl des Überstands abgenommen, die Zellen im Rest des Überstandes resuspendiert und auf einer LB-Platte mit entsprechenden Antibiotika zur Selektion des Plasmids ausplattiert. Alternativ wurden auch 50 – 200 µl ohne vorhergehende Zentrifugation ausplattiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation der Platten für ca. 16 Stunden bei 37°C.

Hitzeschock-Transformation

50 µl ultra-kompetente *E. coli*-Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und mit bis zu 25 ng des Plasmids vorsichtig gemischt. Das Volumen der DNA-Lösung sollte nicht 5% des Volumens der Zell-Suspension überschreiten. Die Zellen wurden für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock bestand aus einer Inkubation bei 42°C für 90 Sekunden. Anschließend wurden die Zellen zwei Minuten auf Eis gekühlt, dann 800 µl SOC-Medium zugegeben und die Zellen für 45 Minuten bei 37°C geschüttelt. Danach wurden die Zellen entweder wie oben bei IV.2.1.12 Elektroporation aufkonzentriert oder 200 µl direkt auf LB-Platten ausgestrichen. Anschließend erfolgte eine Inkubation der Platten für ca. 16 Stunden bei 37°C.

IV.2.1.13. Anlegen von Stammkulturen

Für die Lagerung der Bakterien (inklusive der enthaltenen Plasmide) wurden 100 µl Bakteriensuspension einer Übernacht-Kultur mit 100 µl Stammkulturlösung gemischt, in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80°C aufbewahrt. Auf diese Weise präparierte Bakterienkulturen sind mehrere Jahre lang haltbar.

Stammkulturlösung:

Glycerin	65% (v/v)
MgSO ₄	0,1 M
Tris-Puffer pH 8,0	25 mM

IV.2.2. Plastiden- Transformation

IV.2.2.1. Aufzucht der Pflanzen

Nicotiana tabacum cv. Petit Havana wurde steril angezogen. Hierfür war eine Oberflächensterilisierung der Samen notwendig, die folgendermaßen durchgeführt wurde:

70% EtOH	1 min
5% Chlorox	10 min
H ₂ O steril	3 x 10 min

Falls die Samen gelagert werden sollen, ist es notwendig, sie zu trocknen, um ein Keimen zu verhindern.

Das Keimen der Samen erfolgte in Magentaboxen oder Kirschgläsern mit B5_{mod}-Medium (s. IV.1.14.2) in der Klimakammer bei 25°C , 2000 Lux (Osram L58 W/25 Weiss/Universal, 16 h Licht/ Tag). Nach etwa einer Woche konnten die Keimlinge vereinzelt werden und wurden zu diesem Zweck in Kirschgläser mit je 120 ml B5_{mod}-Medium überführt. Nach etwa drei weiteren Wochen erreichten die Pflanzen eine optimale Größe für die Isolation von Protoplasten.

IV.2.2.2. Protoplasten-Isolation

Präplasmolyse der Blätter und Verdau

Voll entwickelte Blätter wurden steril aus dem Kulturgefäß entnommen und in feine, einen Millimeter breite Streifen geschnitten, wobei die Mittelrippe entfernt und verworfen wurde. Zur Präplasmolyse wurden die Blätter mit der Blattunterseite in 10 ml F-PIN-Lösung (s. IV.1.14.1) gelegt.

Nach 1-2 Stunden Adaption an das Medium wurde die Lösung durch eine enzymhaltige Lösung (9,5 ml F-PIN mit 250 µl Cellulase + 250 µl Macerase, s. IV.1.14.1) ersetzt. Die Blätter wurden ca. 16 Stunden im Dunkeln bei 25°C inkubiert.

Isolierung der Protoplasten

Durch eine Reinigung über Filtration und Stufengradienten-Zentrifugation wurden intakte („flotierende“) Mesophyll-Protoplasten angereichert: Dazu wurde die Protoplasten/Enzymmischung durch ein 100 µm-Metallfilter in sterile Röhrchen überführt, mit 2 ml F-PCN 550 (s. IV.1.14.1) überschichtet und bei 70 g 10 min zentrifugiert. Es bildeten sich drei Banden, wovon die mittlere mit einer Pasteurpipette vorsichtig abgesaugt und in ein neues steriles Röhrchen transferiert wurde. Nachdem mit MMM-Medium (s. IV.1.14.1) auf exakt 10 ml auffüllt wurde, erfolgte die Bestimmung der Zelldichte mit einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer. Anschließend wurden die Protoplasten mittels 10-minütiger Zentrifugation bei 50 g pelletiert und das Pellet in einem entsprechenden Volumen MMM-Medium resuspendiert, um die Dichte der Protoplasten auf 5×10^6 /ml einzustellen.

Alginateinbettung

100 µl der Protoplastensuspension (= 500 000 Protoplasten) wurden mit 2,9 ml F-PCN-Medium verdünnt und diese Suspension dann 1:1 mit Alginate vorsichtig gemischt. Je 625 µl Protoplasten/Alginate Mischung wurde auf eine Ca^{2+} -Agarplatte (s. IV.1.14.1) pipettiert und sofort ein Polypropylen-Netz (10 x 10 Maschen) auflegt. Nach 30 bis 60 Minuten war das Alginate ausgehärtet und das Netz mit den Protoplasten konnte in 10 ml Kulturmedium (F-PCN) transferiert werden. Nach einer Stunde Äquilibrierung wurden die 10 ml gegen 2 ml frisches F-PCN-Medium ausgetauscht.

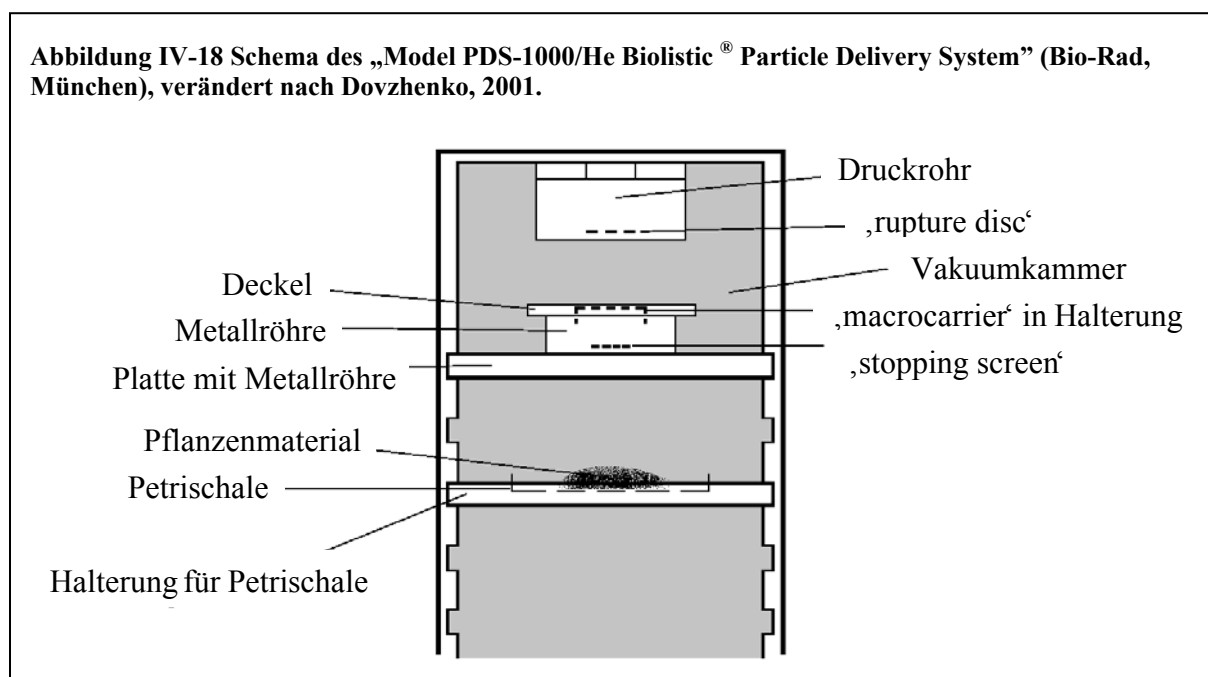
IV.2.2.3. Plastiden-Transformation mit der biolistischen Methode

Vorkultur der Mikrokolonien

Die Protoplasten wurden in F-PCN-Medium einen Tag im Dunkeln und danach eine Woche im Licht kultiviert. Wenn die Mikrokolonien ein 16 – 32-Zellstadium erreicht hatten, wurden sie auf eine 9 cm-RMOP-Platte (s. IV.1.14.2) transferiert und konnten am nächsten Tag mit Hilfe der *particle gun* transformiert werden.

Vorbereitung und Beladen der Goldpartikel

36 μl einer Suspension der Goldpartikel (*microcarrier*, 60 mg/ml in 100% Ethanol, Korngröße 600 nm) wurden abzentrifugiert (10000 g), in 1 ml Wasser wiederaufgenommen und erneut abzentrifugiert. Nach der Resuspendierung in 230 μl Wasser und der Zugabe von 25 μg Vektor-DNA (in sterilem Wasser gelöst), wurde dazu das gleiche Volumen 2,5 M CaCl_2 -Lösung pipettiert, so dass sich die DNA über Ca^{2+} an die Goldpartikel komplexierte. Dieser Komplex wurde durch eine wasserlösliche Spermidinhülle geschützt. Hierfür wurden 50 μl 0,1 M Spermidin zugegeben und der Ansatz 10 Minuten auf Eis inkubiert. Dabei war eine Resuspendierung durch ‚Vortexen‘ notwendig. Die beladenen *microcarrier* wurden bei 8000 g pelletiert, zweimal mit 100% Ethanol gewaschen und in 72 μl 100% Ethanol resuspendiert.



Transformation

Die *macrocarrier* wurden in die vorgesehene Halterung eingefügt. Um zu verhindern, dass die *microcarrier* verklumpen und diese größeren Komplexe die Plastiden schädigten, war *vortexen* notwendig. 5,4 μl der *microcarrier*-Suspension wurden auf die *macrocarrier* pipettiert. Eine *rupture disc* wurde in die Halterung vor dem Druckrohr inseriert, der *stopping screen* und der *macrocarrier* (mit den *microcarrier*n nach unten) eingelegt. Die Mikrokolonien auf der 9 cm-RMOP-Platte (s. IV.1.14.2) wurden in das dritte Fach von unten gelegt. Nach dem Anlegen des Vakuums und dem Aufbau des Helium-Drucks, zerriss die *rupture disc* bei 900 psi und der *macrocarrier* wurde

beschleunigt. Dieser wurde durch den *stopping screen* gestoppt, wodurch die *micro-carrier* in das Blatt geschossen wurden. Nach der Entfernung des Vakuums konnte die Petrischale mit den Mikrokolonien wieder steril verschlossen werden (s. Abbildung IV-18)

Selektion mit aadA als Selektionsmarker

Nach zwei Tagen folgte der Transfer der beschossenen Mikrokolonien auf eine 9 cm-RMOP-Platte (s. IV.1.14.1) mit 500 µg/ml Spectinomycin. Nach zwei Wochen wurden die Kulturen auf neue Platten umgesetzt. Dieser Schritt wurde alle drei Wochen wiederholt. Die Explantate blichen aus, nach ca. sechs Wochen bildeten sich grüne Regenerate. Diese wurden auf 6 cm-RMOP-Platten mit 500 µg/ml Streptomycin umgesetzt. Um Homoplasmie zu erreichen, mussten alle drei Wochen (entspricht einem Selektionszyklus) die grünen Bereiche oder Sprosse auf eine neue 6 cm-RMOP-Platte mit 500 µg/ml Spectinomycin transferiert werden. Isolierte Sprosse konnten auf 70 ml B5_{mod}-Medium (s. IV.1.14.2) mit 500 µg/ml Spectinomycin in Magenta-Boxen bewurzelt werden, worauf ein Transfer ins Gewächshaus zur Samenproduktion erfolgen konnte.

Selektion mit aphA-6 oder nptII als Selektionsmarker

Wie bei der Nutzung von *aadA* als Selektionsmarker folgte nach zwei Tagen der Transfer der beschossenen Mikrokolonien auf eine 9 cm-RMOP-Platte mit 25 µg/ml Kanamycin. Nach zwei Wochen wurden die Kulturen auf neue Platten umgesetzt. Dieser Schritt wurde alle drei Wochen wiederholt. Die Explantate blichen aus, nach ca. sechs Wochen bildeten sich grüne Regenerate. Diese wurden erst auf die gleiche Platte gesetzt, um zu testen, ob sie tatsächlich resistent sind. Regenerate, die grün blieben, wurden auf 6 cm-RMOP-Platten mit 50 µg/ml Kanamycin umgesetzt, wobei damit zu rechnen ist, dass sich weitere Regenerate als nicht resistent herausstellen. Um Homoplasmie zu erreichen, mussten alle drei Wochen (entspricht einem Selektionszyklus) die grünen Bereiche oder Sprosse auf eine neue RMOP-Platte mit 50 µg/ml Kanamycin transferiert werden. Isolierte Sprosse konnten auf 70 ml B5_{mod}-Medium mit 50 µg/ml Kanamycin in Magenta-Boxen bewurzelt werden, worauf ein Transfer in Gewächshaus zur Samenproduktion erfolgen konnte.

IV.2.3. Analyse der Transformanten

IV.2.3.1. PCR

Aus Kalli oder – wenn vorhanden – Blättern wurde mit der CTAB-Methode (s. III.2.1.2) DNA gewonnen. Für die Analyse der möglichen Plastiden-Transformanten wurde die Gesamt-DNA auf 4 ng/µl verdünnt, um 20 oder 40 ng für die PCR verwenden zu können. Folgende Nachweisreaktionen wurden durchgeführt:

Tabelle IV-5 PCR-Analyse der plastidären Transformanten

Nachweis von:	5'-Primer (<i>forward</i>)	3'-Primer (<i>reverse</i>)	Erwartete Fragment- länge [bp]	Hybridisierungstemp- eratur [°C]
<i>ΔoriA</i>	p149	oSM129	1918	60
<i>ΔoriB2</i>	p151	p174	1288	51
<i>ΔoriB1-copy correction</i>	p151	p175	1590	51
<i>modoriB1</i>	p220	p316	795	72

IV.2.3.2. Chloroplasten-Isolation

Die Isolation von Chloroplasten erfolgte bei 4°C im Kühlraum, die notwendigen Zentrifugen und Rotoren (Sorvall, GSA-Rotor, HB-4-Rotor, Hettich-Zentrifuge mit Rotor für Eppendorfreaktionsgefäße) wurden vorgekühlt.

Von acht vier Wochen alten auf B_{5mod}-Medium (s. IV.1.14.2) kultivierten Pflanzen wurden 10-50 mm lange junge Blätter und Sprossspitzen inklusive der Blattanlagen geerntet und mit einem *Warring blender* in 150 ml Isolationsmedium homogenisiert, wofür drei Mal auf der schwächeren Stufe für 10 Sekunden gemixt wurde. Das Homogenat wurde durch doppeltes *Miracloth* (Calbiochem, Darmstadt) in GSA-Zentrifugenbecher filtriert und dann 3 min bei 4000 g (4900 upm), GSA-Rotor bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 – 2 ml Isolationsmedium resuspendiert (vorsichtig schwenken oder vorsichtig mit weichem Pinsel von Wand ablösen).

Die Percoll-Gradienten bestanden aus 12 ml 40% Percoll-Lösung und 5 ml langsam unterschichteter 80% Percoll-Lösung in einem 30 ml-Corex-Zentrifugenröhrchen. Auf den Gradienten wurde das resuspendierte Pellet mit einer weiten Spitze aufgetragen

und 25 min bei 14800 g (9500 upm) im HB-4-Rotor bei 4°C zentrifugiert. Nachdem die oberste Bande – zerstörte Plastiden, Zellreste – abgenommen war, konnte die Bande der intakten Chloroplasten an der Grenze zwischen der 40%- und der 80%-Percoll-Lösung abgenommen und in ein neues 30 ml-Corex-Zentrifugenröhrchen überführt werden. Das Waschen erfolgte dadurch, dass mit Isolationsmedium auf ca. 25 ml aufgefüllt und 5 min bei 4000 g (4900 upm) im HB-4-Rotor bei 4°C zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in Isolationsmedium re-suspendiert, in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und das Volumen bestimmt. Das Volumen kann durch 3 min Zentrifugation bei 2000 g eingeschränkt werden, um eine dunkelgrüne Suspension für die Chlorophyll-Konzentrationsbestimmung zu erhalten.

IV.2.3.3. Chlorophyll-Konzentrationsbestimmung

5 µl dunkelgrüne Chloroplasten-Suspension wurden mit 995 µl 80% Aceton gemischt (vortexen) und 3 min bei 12 000 upm zentrifugiert. Nachdem der Überstand in eine Küvette überführt wurde, konnte die OD bei 645 nm und 663 nm bestimmt werden. Die Berechnung der Konzentration in µg/µl erfolgte mit folgender Formel:

$$\frac{(OD_{645 \text{ nm}} \times 20,2) + (OD_{663 \text{ nm}} \times 8,02) \times 200}{1000} \quad (200 \text{ ist der Verdünnungsfaktor})$$

Für PFGE und FISH wurde die Dichte der Chloroplasten-Suspension auf eine Chlorophyll-Konzentration von 5 µg/µl mit folgender Formel eingestellt, um das notwendige Volumen zu berechnen:

$$\frac{(\text{Volumen in } \mu\text{l}) \times (\text{Chlorophyllkonzentration})}{5}$$

Falls das Volumen hierfür reduziert werden musste, wurde 3 min bei 2000 g und 4°C zentrifugiert und das Pellet in dem errechneten Volumen aufgenommen. Die Chloroplasten konnten so direkt für PFGE oder FISH verwendet werden oder sie wurden mit 50% Glycerin gemischt (Dichte zuvor entsprechend neu einstellen) und bei – 80°C gelagert.

Isolationsmedium

Sorbit	0,4 M
HEPES	50 mM
EDTA	2 mM

Autoklavierbar, mit 5 M KOH auf pH 8,0 einstellen.

Percoll-Lösungen

Sorbit	0,4 M
HEPES	50 mM
EDTA	2 mM

in Volumen minus dem Volumen des Percoll lösen.
Autoklavierbar, mit 5 M KOH auf pH 8,0 einstellen.

40% bzw. 80% Percoll erst nach Autoklavieren zugeben.

IV.2.3.4. PFGE mit plastidärer DNA

Da bei PFGE große Fragmente aufgetrennt werden, ist es notwendig die DNA so zu isolieren, dass sie nicht durch Scherkräfte, wie sie bei einer normalen DNA-Isolation auftreten (s. III.2.1.2), fragmentiert wird. Die Chloroplasten wurden deshalb in einen Agaroseblock eingegossen und innerhalb der Agarose-Matrix die DNA isoliert.

Für die Herstellung der Agarose-Blöcke wurden 9 mg Insert-Agarose (Cambrex, Verriers) plus 1,2 µl Mercaptoethanol (= 90 mM) in 1 ml LMP-Puffer bei 95°C erhitzt und, nachdem das Gel geschmolzen war, auf 42°C abgekühlt. Die Chloroplastensuspension, von der 12,5 µl pro Block benötigt wurden, wurde auf 42°C erwärmt. Die Suspension wurde mit 3 Volumen der LMP-Agarose-Lösung gemischt und in eine Gießvorrichtung, die unten mit 0,1 g Seakam LE Agarose (FMC BioProducts, Rockland, Maine, USA) in 10 ml LMP-Puffer abgedichtet wurde, gegossen.

Die festen Blöcke konnten in ein 2 ml Eppendorfreaktionsgefäß überführt werden, in welches 1,5 ml Lysepuffer vorgelegt wurde. Nachdem die Blöcke 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln geschüttelt wurden, wurde die Lösung gegen Lysepuffer plus Proteinase K (0,2 mg/ml) ausgetauscht und über Nacht bei 50°C geschüttelt.

Die Inaktivierung der Proteinase K erfolgte durch zwei Mal Waschen mit TE-Puffer plus 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF, Inhibitor von Serin- und Cystein-Proteasen) für 30 min bei Raumtemperatur, worauf noch vier Mal mit TE-Puffer für 30

min bei Raumtemperatur gewaschen wurde. Die Blöcke waren dann bei 4°C im Dunkeln lagerbar.

Falls die Blöcke für einen Restriktionsverdau für die Kartierung von Enden linearer ptDNA-Moleküle eingesetzt werden sollten, erfolgte eine Prä-Elektrophorese: die Blöcke wurden in Taschen eines 0,8% Agarosegels mit 1x TBE-Puffer mit 1% Agarose eingegossen. Durch einen zweistündigen Gellauf mit 3 V/cm wurden alle Moleküle, die ins Gel einwandern können, entfernt. Hierdurch wurde auch der ‚Schmier‘ entfernt, der die eigentlichen Banden des Restriktionsverdaus überdeckt hätte. Nachdem die Blöcke wieder ausgeschnitten wurden, konnte das Ergebnis durch Anfärben des restlichen Gels mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid überprüft werden.

Für den Restriktionsverdau, bei dem nur noch der Teil der ptDNA analysiert wurde, der nach der Prä-Elektrophorese noch im Block verblieb, wurden die Blöcke eine halbe Stunde in 100 µl des für das jeweilige Enzym spezifischen Puffer geschüttelt. Anschließend erfolgte der Austausch gegen 10 u Restriktionsenzym in 100 µl Puffer und die Inkubation des Ansatzes bei 37°C. Nach 1 – 2 Stunden wurden weitere 10 u des Enzyms zugegeben und der Ansatz über Nacht inkubiert.

Alle Blöcke – unabhängig davon, ob sie verdaut wurden oder nicht – wurden unmittelbar vor dem Gellauf für mindestens 15 min bei Raumtemperatur in TBE-Puffer geschüttelt.

Der 0,5x TBE-Puffer wurde jeweils frisch hergestellt und musste ca. eine Stunde in der Gelkammer auf 12°C vorgekühlt werden. Es wurde 1% Agarosegel (Seakem LE Agarose) in 110 ml 0,5x TBE verwendet. Die Blöcke wurden in die Taschen eingefügt und mit 1% Seakem LE-Agarose in 0,5x TBE fixiert. Ebenso wurde mit dem Marker verfahren, wobei dünne Scheiben des λ-PFGE-Markers von New England Biolabs, Frankfurt/Main verwendet wurden.

Verwendet wurde eine ‚2015 Pulsaphor Electrophoresis Unit‘ mit einer CHEF-Elektrodenanordnung (LKB Bromma, heute GE Healthcare, München), eine ‚2015 Pulsaphor Plus‘-Steuereinheit (LKB Bromma, heute GE Healthcare, München) und eine ‚Gene Power Supply GPS200/400‘-Stromquelle (Pharmacia, heute GE Healthcare, München). Der Lauf erfolgte mit 6 V/cm bei 12°C und folgenden Programmen:

- Gradient von 60 Sekunden- bis 0,1 Sekunden-Pulsen über 23:27 h für die Auftrennung eines großen Bereiches (bis zum Tetramer bei ptDNA)
- 10 Sekunden-Pulse für 24 Stunden für die Auftrennung von kleineren Fragmenten (50 bis 250 kb)

Die Detektion der Banden erfolgte durch eine ca. einstündige Färbung mit Ethidiumbromid (20 µg/200 ml 0,5x TBE-Puffer). Teilweise wurde das Gel ein bis zwei Mal mit 0,5x TBE-Puffer entfärbt, um die Banden deutlicher zu machen.

Diese Gele konnten mit einer Southern-Analyse weiter untersucht werden, wobei eine Depurinierung (10 min in 0,125 M HCl) notwendig war.

LMP:

Na-EDTA	125 mM
Sorbit	330 mM
Na-Citrat	25 mM
Mit HCl auf pH 7,0 einstellen	

Lysepuffer

Tris/HCl pH 8,0	10 mM
Na-EDTA	100 mM
SLS	1% (w/v)

Waschlösung 1

Na-EDTA	10 mM
Tris/HCl pH 8,0	10 mM
PMSF	1 mM

Waschlösung 2

Na-EDTA	1 mM
Tris/HCl pH 8,0	10 mM

0,5x TBE

TRIS	19,080 g (45 mM)
Borsäure	9,738 g (45 mM)
EDTA	1,303 g (1 mM)

Auf 3,5 l mit Wasser auffüllen.

PMSF

200 mM Stocklösung in Ethanol (gelagert bei -20°C, wieder Lösen eventuell notwendig).

IV.2.3.5. Southern-Analyse

Restriktionsanalyse von putativen Transformanten

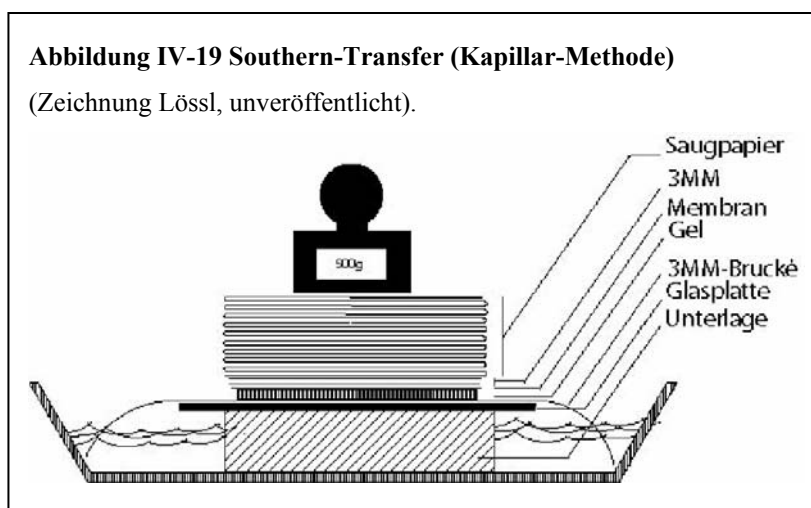
Der Nachweis der gerichteten Insertion der gewünschten Sequenzen und des homoplasmatischen Zustands der transplastomischen Linien erfolgte über eine Restriktions- und Southern-Analyse. Die DNA wurde mit der CTAB-Methode (siehe III.2.1.2) gewonnen. Von möglichen plastidären Transformanten wurden 2 µg DNA eingesetzt. Die DNA wurde mit einem geeigneten Restriktionsenzym über Nacht geschnitten. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte mit einem Agarose-Gel (0,8%, mit 0,3 µg Ethidiumbromid/ml Gel).

Depurinierung

Bei Fragmenten über 10 kb ist eine Depurinierung der DNA notwendig, um einen Transfer auf die Membran zu ermöglichen. Dies war allgemein bei PFGE-Gelen notwendig, aber vereinzelt auch bei kombinierten Restriktions- und Southern-Analysen. Die Depurinierung erfolgte durch eine Inkubation in 0,125 M HCl für 10 Minuten. Sie wurde durch Waschen mit 0,4 M NaOH gestoppt. Das Gel wurde anschließend noch 30 Minuten in 0,4 M NaOH geschüttelt, um die DNA für den alkalischen Transfer zu denaturieren.

Alkalischer Transfer

Der Transfer wurde in 0,4 M NaOH über Nacht auf eine positiv geladene Nylonmembran (N⁺-Nylonmembran, Amersham, Freiburg) durchgeführt, wobei der Kapillarsog als Antrieb dient. Der Transfer wurde im Alkalischen durchgeführt, um die DNA einzelsträngig auf die Membran zu übertragen (s. Abbildung IV-19).



Die Membran wurde nach dem Transfer dreimal in 2x SSC-Puffer gewaschen, um sie zu neutralisieren. Die Fixierung der DNA erfolgte bei 80°C (30 Minuten) und an-

schließender UV-Bestrahlung mit dem „Ultraviolet Crosslinker“ (Amersham, jetzt GE Healthcare, München).

Dot-Blot

Um die DNA-Konzentration zu bestimmen, wurden von jeder Probe drei Aliquots à 1 µl auf ein Agarose-Gel aufgetragen und die Konzentration mit ‚One D Scan‘ gemessen. Für die Messung der Kern-DNA wurden 2 µg und für die Messung der Plastiden-DNA 100 ng auf die Membran transferiert. Für den Transfer wurde die Membran und darunter ein Whatman-Papier in eine Dot-Blot-Apparatur eingelegt und jede Tasche mit 200 µl Wasser eingeweicht. Die DNA wurde in 200 µl Wasser gelöst und durch Anlegen von Vakuum auf die Membran transferiert. Anschließend wurden 200 µl 0,4 M NaOH aufgetragen und mittels Vakuum durch die Membran gesaugt, um die DNA auf der Membran zu denaturieren. Die Membran wurde danach mit 2x SSC-Puffer gewaschen. Die Fixierung der DNA erfolgte durch Inkubation bei 80°C für 30 Minuten und Bestrahlung mit UV-Licht mit dem „Ultraviolet Crosslinker“ (Amersham, jetzt GE Healthcare, München).

Für jede Probe wurden drei Aliquots aufgetragen, wobei darauf zu achten war, dass die Membran so geteilt werden konnte, dass die Proben für die Bestimmung der Kern-DNA bzw. für die Bestimmung der Plastiden-DNA zusammenblieben.

Sonden

Die Sonden wurden mittels PCR amplifiziert oder aus Plasmiden ausgeschnitten und über Agarose-Gelelektrophorese und ‚QIAquick gel extraction kit‘ aufgereinigt. Die radioaktive Markierung erfolgte mit α -³²P-dCTP mit Hilfe des ‚prime-a-gene labelling system‘ (Promega, Mannheim):

25 ng Sonde wurden in 10 µl Wasser gelöst, 7 Minuten bei 95°C denaturiert und danach die Reaktionsmischung zugegeben:

5x Puffer	1/5 Volumen
dATP, dGTP, dTTP	je 20 µM
BSA	400 µg/ml
α - ³² P-dCTP	333 nM (bei 50 µCi, 3000 Ci/mmol)
Klenow-Fragment	5 u
Mit Wasser auf 50 µl auffüllen.	

Dieser Ansatz wurde eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und über eine ‚MicroSpin-Columns S-200 HR‘-Säule aufgereinigt. Hierbei wurden Sonden in 150 µl TE-

Puffer aufgenommen. λ -Marker wurden in 50 μ l aufgenommen und davon 5 – 10 μ l zu der Sonde hinzugegeben. Vor Zugabe zum Hybridisierungspuffer wurden die markierten Sonden sieben Minuten bei 95° C denaturiert.

Hybridisierung

Die Vorhybridisierung zur Absättigung unspezifischer Bindungsmöglichkeiten erfolgte bei 65°C für 1,5 Stunden in ca. 15 ml Hybridisierungspuffer, anschließend wurde die Membran über Nacht mit Sonden und λ -Marker in 7,5 ml Hybridisierungspuffer bei 65°C inkubiert. Unspezifisch gebundene Sonden wurden durch folgende Waschschritte entfernt:

1x 30' bei 60°C mit 0,5x SSC-Puffer und 0,1% (w/v) SDS

2x 30' bei 65°C mit 0,1x SSC-Puffer und 0,1% (w/v) SDS

Nach Exposition der Membran auf einer Phosphoimager-Platte (Fujifilm) erfolgte die Detektion der Signale mit dem BAS 1500-Phosphoimager (Fujifilm). Die Exposition variierte zwischen einer Stunde (bei Transformanten) und einer Woche (bei PFGE-Gelen).

Strippen

Um Membranen mehrfach mittels Southern-Analyse untersuchen zu können, was insbesondere bei den PFGE-Analysen notwendig war, wurden die Sonden durch ‚strippen‘ entfernt. Hierfür wurde 0,1% SDS kochend auf die Membran gegeben und noch einmal mit der gleichen Lösung gewaschen. Mit einem Geigerzähler wurde überprüft, ob das ‚strippen‘ erfolgreich war.

Hybridisierungspuffer (nach Church und Gilbert, 1984)

Na ₂ HPO ₄ / NaH ₂ PO ₄ (pH 7,5)	250 mM
SDS	7% (w/v)

20 x SSC

NaCl	3,0 M
Natriumcitrat (pH 7)	0,3 M

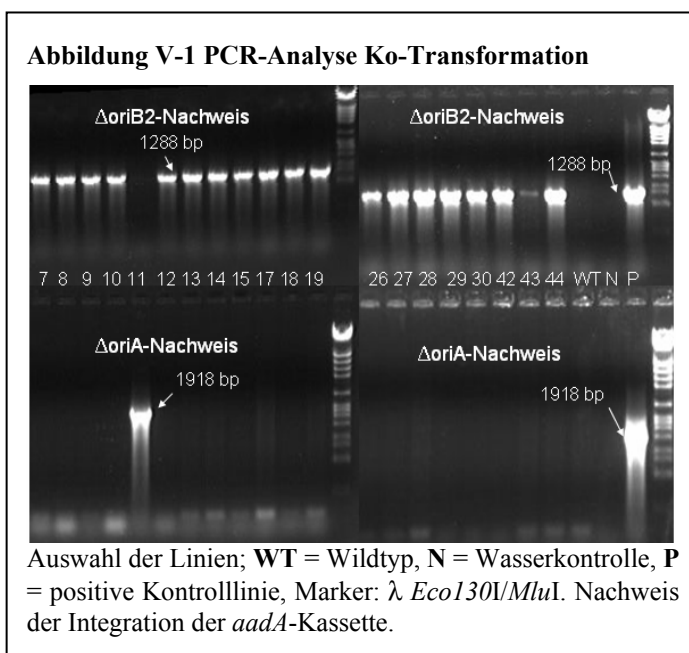
V. Ergebnisse

V.1. Inaktivierung der Replikationsursprünge *oriA* und *oriB*

V.1.1. Deletion von *oriA* und *oriB2*

V.1.1.1. Ko-Transformation mit zwei Vektoren

Mittels einer Ko-Transformation mit den Vektoren pA4 und pB2 (Mühlbauer et al., 2002, s. Abb. IV-1, IV-2) – beide Vektoren trugen *aadA* als Selektionsmarker – sollten beide *oriA* und der *oriB2* (im *orf350*) inaktiviert werden. Das Ziel war, festzustellen, ob es möglich ist, beide Replikationsursprünge in einem *inverted repeat* (*IR*) auszuschalten. In den vorausgegangenen Arbeiten war es möglich gewesen, beide *oriA* zu deletieren und – bei einem getrennten Experiment – den *oriB2* zu deletieren (Mühlbauer et al., 2002). Das Experiment (Transformation 317) zur Ko-Transformation mit beiden Vektoren erbrachte eine Vielzahl von resistenten Linien. Bei 37 von 38 analysierten Linien konnte ein *oriB2-knockout* mittels PCR nachgewiesen werden, während nur bei einer Linie ein *oriA-knockout* gefunden wurde. In dieser Linie



ergab der Nachweis eines *oriB2-knockout* auch eine schwache Bande, die allerdings im nächsten Selektionszyklus verloren ging (Abb. V-1). Mittels einer Ko-Transformation konnte also das Ziel nicht erreicht werden.

V.1.1.2. Übertransformation bereits vorhandener Deletionsmutanten

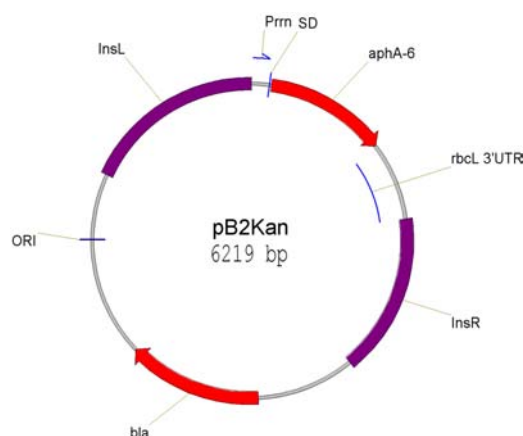
Als alternativer Ansatz wurde das Spectinomycin- und Streptomycin-Resistenzgen *aadA* im Vektor pB2 (Mühlbauer et al., 2002, s. Abb. IV-2) gegen das Kanamycin-Resistenzgen *aphA-6* ausgetauscht, so dass eine Spectinomycin-resistente Linie mit deletierten *oriAs* (282-14, Mühlbauer et al., 2002) mit dem neuen Vektor pB2kan (s. Abb V-2) übertransformiert werden konnte. Hierfür wurde die *aphA-6*-Kassette verwendet, die sich aus dem Promotor des plastidären ribosomalen Operons (Prn), ei-

ner Shine-Dalgarno-Sequenz, dem Kanamycin-Resistenzgen *aphA-6* und der 3'-UTR von *rbcL* aus *Chlamydomonas reinhardtii* zusammensetzt. Die Kasette wurde mit *NcoI* und *Acc65I* aus dem Vektor pKKm (s. Abb. IV-4) herausgeschnitten und in den mit gleichen Restriktionsenzymen geschnittenen Vektor pB2 an der Stelle von *aadA* inseriert.

Mittels dieses Ansatzes konnten Kanamycin-resistente Linien erzeugt werden, die aber heteroplastomisch blieben (Abb. V-7 d, e, Transformation 320). Wie erwartet, sind die Linien auch $\Delta oriA$, da dies bereits die Ausgangslinien der Übertransformation waren (s. Abb. V-6 e, g), Transformation 320).

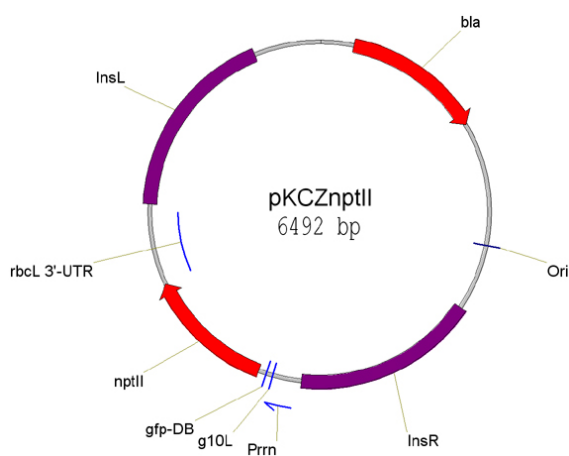
Um die Selektion zu verbessern, wurde eine für eine hohe Translation optimierte Kasette für das Kanamycin-Resistenzgen *nptII* hergestellt. *nptII* wurde aus dem Sure-*E. coli*-Stamm mittels PCR isoliert, wobei an die Primer die Restriktionsschnittstellen für *NdeI* (5', p249) bzw. *PstI* und *SaII* (3', p250) angehängt wurden und das Stoppcodon von TGA zu TAA mutiert wurde. Meuer et al. (2002) zeigten, dass der *release factor* AtrpFB, der das Stoppcodon TGA erkennt, nicht in jeder Zelle exprimiert wird und deshalb die Nutzung des TGA-Stoppcodons für Expressionskassetten nachteilhaft sein kann. Das modifizierte *nptII*-Gen wurde in pUC18 (Norrander et al., 1983, s. Abb. IV-5) kloniert (pUCnptII, s. Abb. IV-6). Aus diesem wurde es mit *NdeI* und *SaII* ausgeschnitten und in das mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnittene Plasmid pGEMPNG1014 (Scharff, 2002, s. Abb. IV-7) inseriert (pGEMPNG1014anptII, s. Abb. IV-8). Dieses Plasmid enthält den Prrn-Promotor für

Abbildung V-2: pB2kan



Transformationsvektor für die Deletion des *oriB2*. Der Selektionsmarker ist *aphA-6*. InsL und InsR sind die Flanken für Integration mittels homologer Rekombination.

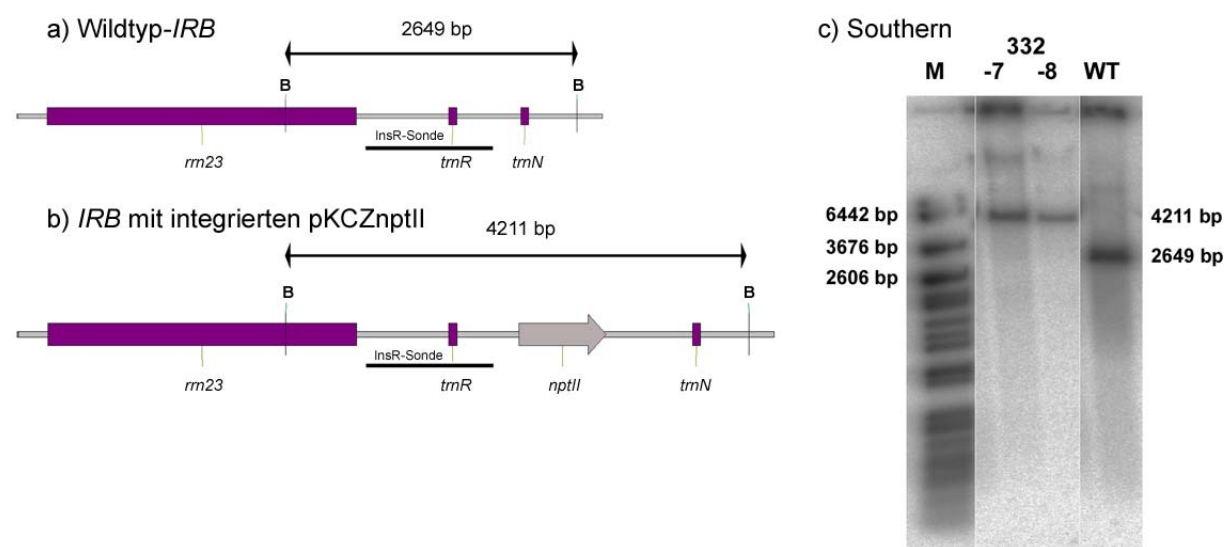
Abbildung V-3: pKCZ nptII



Transformationsvektor für den Test der *nptII*-Kasette. Ins L und InsR dienen der Integration ins Plastom zwischen *trnR* und *trnN*.

die plastidär-kodierte RNA-Polymerase (PEP) und die kern-kodierte RNA-Polymerase (NEP), die 5'-UTR des T7-Phagen (g10L) und die *downstream box* (DB) des *gfp*-Gens. Die Insertion der Promotoren, der 5'-UTR und des *nptII*-Gens mit der fusionierten *gfp*-Sequenz erfolgte in den pKCZ-Vektor (Zou et al., 2003, s. Abb. IV-9), um die Kassette zu testen. Hierfür wurden pGEMPNG1014anptII und pKCZgIpK (Scharff, 2002, s. Abb. IV-10) mit *XhoI* und *PstI* geschnitten und die Kassette in den pKCZ-Vektor ligiert (pKCZnptII, s. Abb. V-3). Mit diesem Vektor war es möglich, *Nicotiana tabacum* zu transformieren und homoplastomische Linien zu erhalten (siehe Abb. V-4, Transformation 332). Die neue Selektionskassette war also funktionsfähig. In einer früheren Arbeit, in der *nptII* in einer nicht für hohe Translation optimierten Kassette als Selektionsmarker genutzt wurde, waren nur 3,9% der resistenten Linien plastidäre Transformanten und der Rest Kern-Transformanten (Carrer et al., 1993). Hier waren vier von vier untersuchten Linien plastidäre Transformanten. Neben *aadA* (Svab & Maliga, 1993) und *aphA-6* (Huang et al., 2002) steht also ein dritter Selektionsmarker für die Plastidentransformation zur Verfügung.

Abbildung V-4: Southern-Analyse zum Nachweis der Integration von pKCZnptII

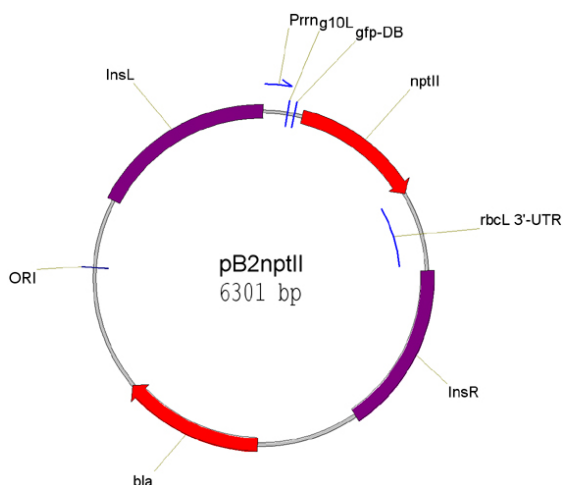


Southern-Analyse: Verdau der Gesamt-DNA mit *BspI20I* (B). Nachweis mit InsR-Sonde. Als Marker diente λ Eco47I und als Negativkontrolle wurde DNA des Wildtyps (WT) von *Nicotiana tabacum* verwendet. **a)/b):** Schemata der Integrationsstelle im IR_B im Wildtyp und der Transformante. Die Situation im IR_A ist identisch. **c):** Southern-Analyse: gezeigt sind die Linien 332-7 und 332-8, die homoplastomisch die *nptII*-Kassette inseriert haben.

Um den eigentlichen *oriB2*-Deletionsvektor herstellen zu können, wurde pKCZnptII (s. Abb. IV-11) mit *XhoI* und *Acc65I* und pB2 (s. Abb. IV-2) mit *Mph1103I* und *Acc65I* geschnitten und danach glatte Enden hergestellt (*blunt ends*). Die Fragmente wurden zu dem Vektor pB2nptII ligiert (s. Abb. V-5).

Durch Übertransformation von $\Delta oriA$ -Linien (282-14, Mühlbauer et al., 2002) mit pB2nptII konnten Linien hergestellt werden, denen auf allen Kopien des Plastoms der *oriB2* fehlt (Transformation 345, s. Abb. V-7 c, f). Erwartungsgemäß waren die Linien auch $\Delta oriA$ (s. Abb. V-6 f, g). Es ist also möglich, drei Ori zu deletieren – u.a. beide für die θ -Replikation als essentiell beschriebene Ori im *IR_B*.

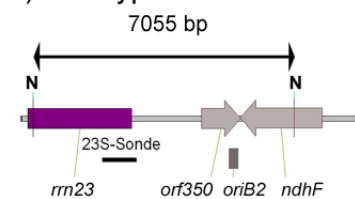
Abbildung V-5: pB2nptII



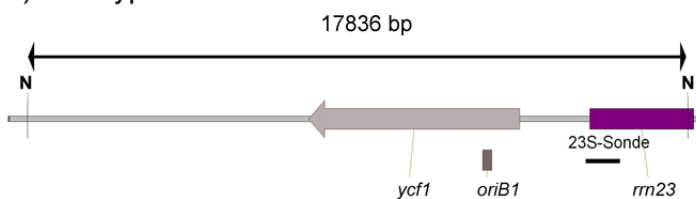
Transformationsvektor für die Deletion des *oriB2*. Der Selektionsmarker ist *nptII*. InsL und InsR sind die Flanken für Integration mittels homologer Rekombination.

Abbildung V-7 Southern-Analyse: Nachweis $\Delta oriB2$

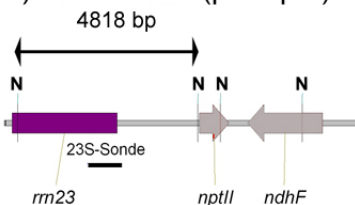
a): Wildtyp-*IRB*



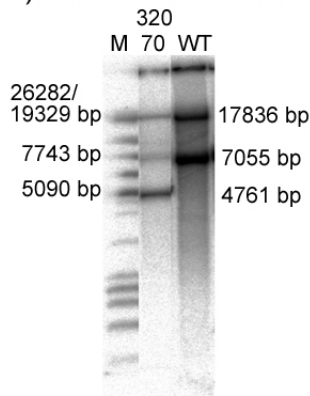
b): Wildtyp-*IRA*



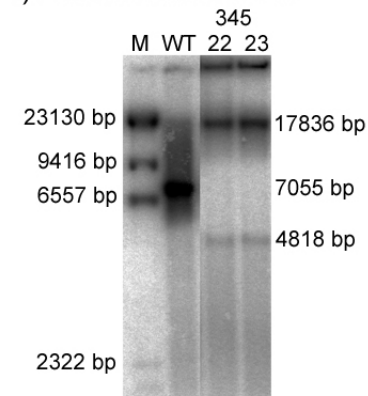
c): $\Delta oriB2$ -*IRB* (pB2nptII)



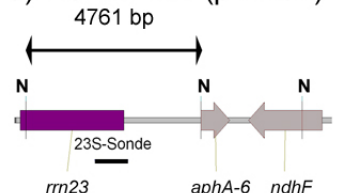
e): Transformation 320



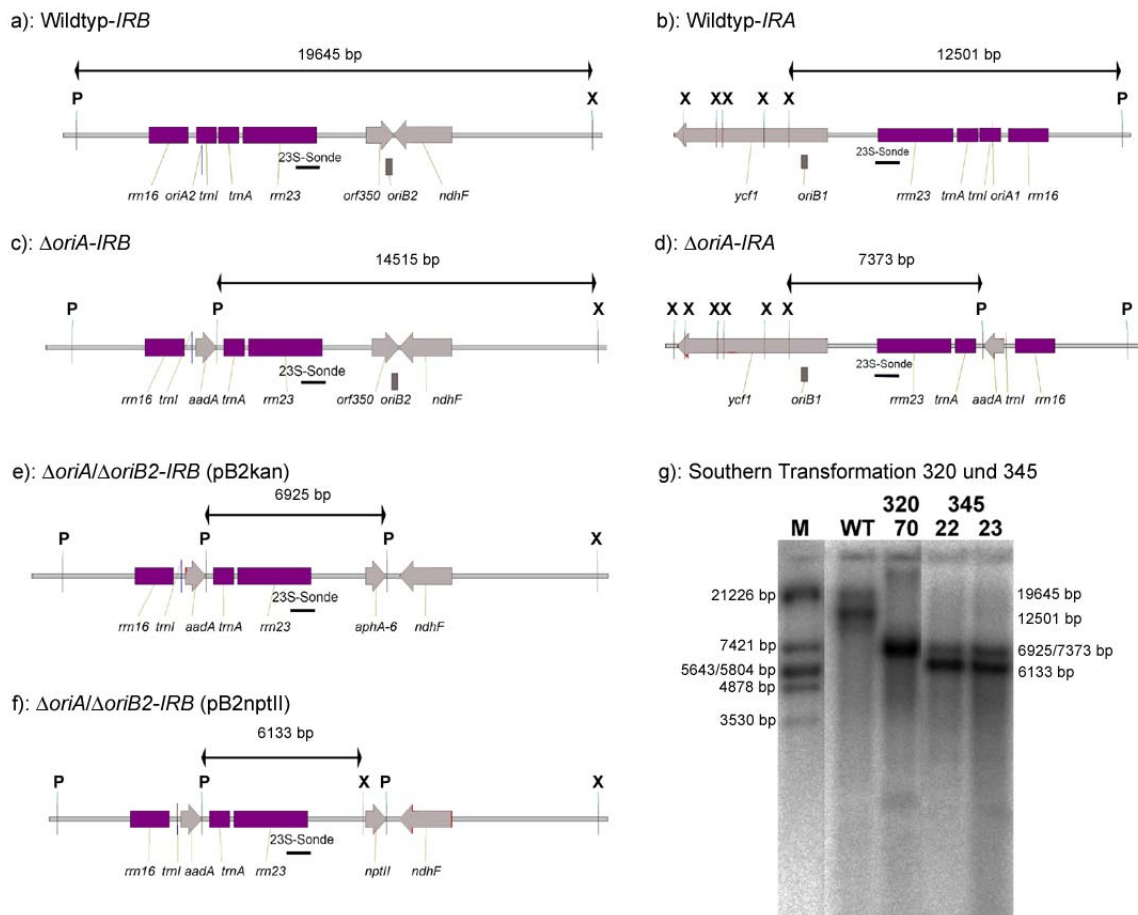
f): Transformation 345



d): $\Delta oriB2$ -*IRB* (pB2kan)



Southern-Analyse: Verdau der Gesamt-DNA mit *NcoI* (N). Nachweis mit 23S-Sonde. Als Marker (M) diente λ Eco130I/*MluI* (bei e) bzw. λ HindIII (bei f). Als Negativkontrolle wurde DNA des Wildtyps (WT) von *Nicotiana tabacum* verwendet. a)/b): Schema für Wildtyp-Situation, die der Situation in $\Delta oriA$ -Linien entspricht. c): Schema für *IR_B* bei $\Delta oriB2$ mittels des Vektors pB2nptII. *IR_A* entspricht hier b). d): Schema für *IR_B* bei $\Delta oriB2$ mittels des Vektors pB2kan. *IR_A* entspricht hier b). e): Die Linie 320-70, die heteroplastomisch deletiertem *oriB2*. f): Die Linien 345-22 und 345-23, die homoplastomisch den *oriB2* deletiert haben.

Abbildung V-6: Southern-Analyse zum Nachweis von $\Delta oriA$ 

Southern-Analyse: Verdau der Gesamt-DNA mit *Pst*I (P) und *Xba*I (X). Nachweis mit 23S-Sonde. Als Marker wurde λ *Eco*RI (M) und als Negativkontrolle wurde DNA des Wildtyps (WT) von *Nicotiana tabacum* verwendet. a)/b): Wildtyp-Situation. c)/d): Situation in $\Delta oriA$ -Linie. e): *IR_B* in $\Delta oriA/oriB2$ -Linie, die mittels Übertransformation mit pB2kan erzeugt wurde. *IR_A* entspricht d). f): *IR_B* in $\Delta oriA/oriB2$ -Linie, die mittels Übertransformation mit pB2nptII erzeugt wurde. *IR_A* entspricht d). g): Gezeigt sind die Linien 320-70, 345-22 und 345-23, die homoplastomisch $\Delta oriA$ sind.

V.1.1.3. Stabilität von *oriB*-Deletionslinien

Untersuchungen der vorhandenen Linien mit *oriB2*-Deletionen (273-40, -51, Mühlbauer et al., 2002) mittels PCR zeigten (Abb. V-8), dass diese im Gewächshaus ohne Antibiotika-Selektion instabil sind und die Deletion mit Hilfe der *oriB1*-Sequenz wieder kurieren können (*copy correction* bzw. *gene conversion*, Lemieux & Lee, 1987, Birky & Walsh, 1992, Khakhlova & Bock, 2006). Diese Linien können, wie die $\Delta oriA/\Delta oriB2$ -Linien (Transformation 345), also nur *in vitro* unter Selektionsdruck erhalten werden.

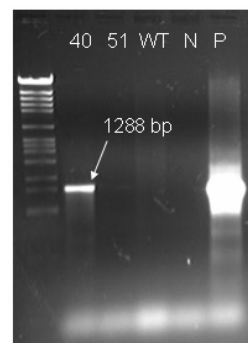
V.1.2. Inaktivierung von *oriB1* ohne gleichzeitige Inaktivierung von *ycf1*

Da der *oriB1* innerhalb des essentiellen *ycf1*-Gens liegt, ist es nicht möglich, homoplastomische *oriB1*-Deletionslinien zu erhalten (Drescher et al., 2000, Mühlbauer et al., 2002). Als Alternativansatz sollte die Sequenz des *stem loops* des *oriB1* unter Erhaltung der Aminosäuresequenz von *ycf1* mutiert werden. Dafür wurde ein neuer Transformationsvektor hergestellt. Dieser besteht aus einer 2 kb-Insertionsflanke, die den 5'-Bereich der kodierenden Region von *ycf1*, dessen Promotor und 5'-UTR und den nativen *oriB1* enthält (Drescher, 2003), sowie aus einer 1 kb-Insertionsflanke, die *orf75*, *trnN* und *trnR* umfasst. Zwischen die Insertionsflanken wurde eine Selektionskassette (mit *nptII*) eingefügt. In den nativen *oriB1*, der in etwa in der Mitte der 2 kb-Insertionsflanke liegt, wurde dann zwischen zwei *Bam*HI-Schnittstellen die modifizierte Sequenz zur Eliminierung des *stem loops* eingefügt (s. Abb. V-9).

Die 2-kb-Insertionsflanke wurde mit Primern, die die Restriktionschnittstellen für *Hind*III (5', p222) bzw. *Xho*I und *Sal*I (3', p223) enthalten, mittels PCR aus dem Plasmid von *Nicotiana tabacum* amplifiziert und in pUC18 (Norrander et al., 1983, s. Abb. IV-5) eingefügt (pUCInsL, s. Abb. IV-13). Aus dem Vektor pKCZ (Zou et al., 2003, s. Abb. IV-9) wurde mit *Xho*I und

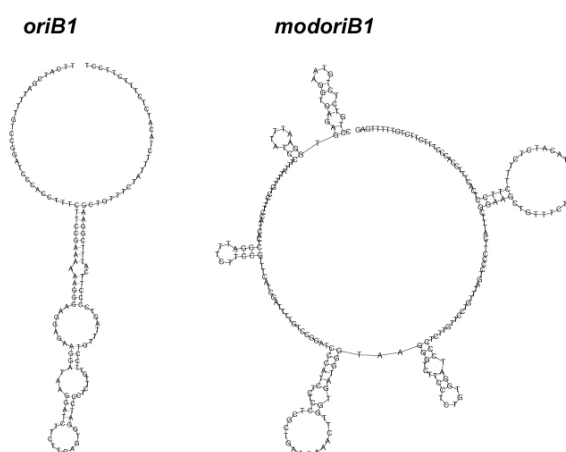
*Acc*65I die *aadA*-Kassette, bestehend aus dem *Prrn*-Promotor, einer Shine-Dalgarno-Sequenz, dem Spectinomycin- und Streptomycin-Resistenzgen *aadA* und der 3'-UTR von *rbcL* aus *Chlamydomonas reinhardtii*, ausgeschnitten und in das mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnittene Plasmid pUCInsL (s. Abb. IV-13) eingefügt

Abbildung V-8 PCR-Analyse *copy correction oriB2*



Nachweis $\Delta oriB2$ über Nachweis der Integration der *aadA*-Kassette. 273-40/51 = $\Delta oriB2$ -Linien aus Gewächshaus, WT = Wildtyp, N = Wasserkontrolle, P = positive Kontrolllinie, Marker $\lambda Eco130I/MluI$. Schwaches Signal bei 40, kein Signal bei 51. Bei 51 ist die *aadA*-Kassette nicht mehr detektierbar.

Abbildung V-9 *stem loop* des *oriB1*



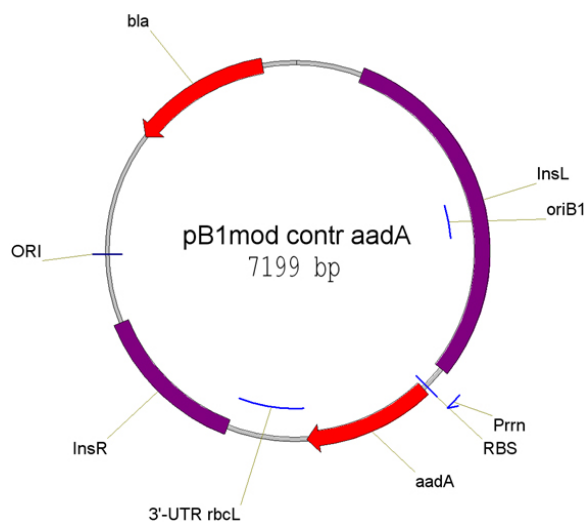
Links die Sekundärstruktur des *oriB1* und rechts die Struktur der mutierten Sequenz (*modoriB1*) (erstellt mit ViennaRNA-1.5 nach DNA-Parametern).

(pUCInsLaadA, s. Abb. IV-14). Das zusammengefügte Plasmid wurde mit *KpnI* geschnitten, glatte Enden erzeugt und mit der aus dem Plasmid von *Nicotiana tabacum* mittels PCR (Primer p224 und p225) amplifizierten 1 kb-Insertionsflanke ligiert. Der verwendete 5'-Primer (p224) hatte die *KpnI/Acc65I*-

Restriktionsschnittstelle angehängt, so dass diese erhalten blieb. Der jetzt entstandene pB1mod contr aadA-Vektor (s. Abb. V-10) wurde

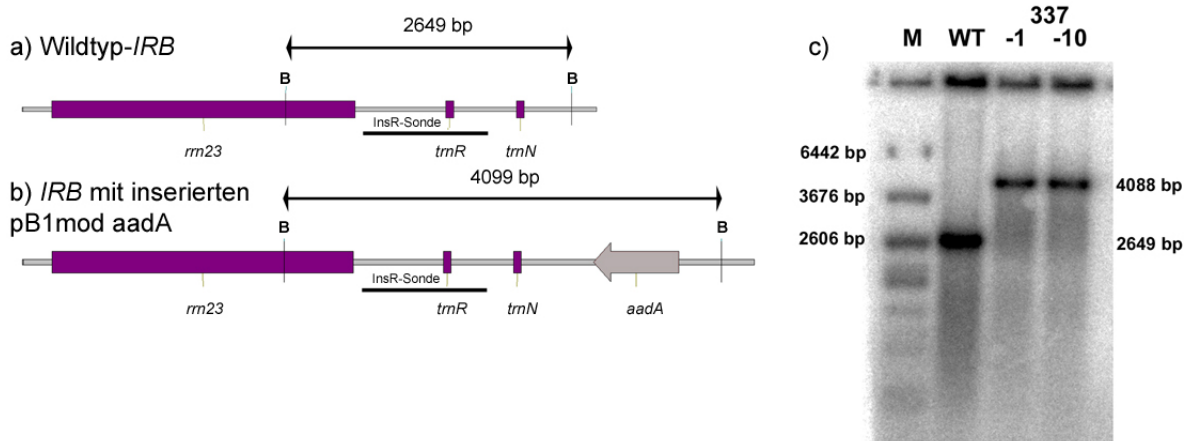
benutzt, um zu testen, ob die Insertion zwischen *ycf1* bzw. *orf350* und *orf75* neutral ist (Transformation 337). Abb. V-11 zeigt die homoplastomische Insertion in beide *inverted repeats*. Die Insertionsstelle für den Selektionsmarker ist also neutral.

Abbildung V-10 pB1mod contr aadA



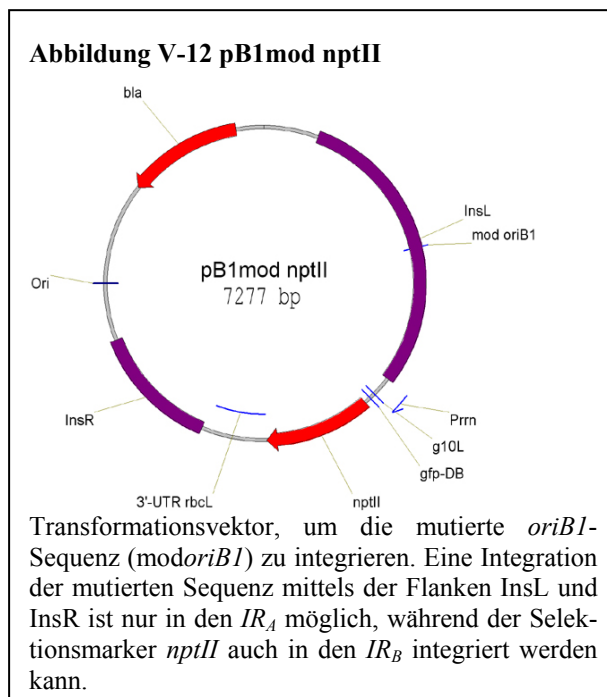
Transformationsvektor, um zu testen, ob die Insertion des Selektionsmarkers zwischen *ycf1* bzw. *orf350* und *orf75* neutral ist. *aadA* ist hier der Selektionsmarker, InsL und InsR sind Flanken für die Insertion in das Plasmid mittels homologer Rekombination. *oriB1* in InsL ist intakt.

Abbildung V-11 Southern-Analyse: Nachweis der Integration von pB1mod contr aadA



Southern-Analyse: Verdau der Gesamt-DNA mit *BspI20I* (B). Nachweis mit InsR-Sonde. Als Marker diente λ Eco47I und als Negativkontrolle wurde DNA des Wildtyps (WT) von *Nicotiana tabacum* verwendet. **a)/b)**: Schemata der Insertionsstelle im *IR_B* im Wildtyp und der Transformante. Die Insertionsstellen sind in diesem Fall in beiden *inverted repeats* identisch. pB1mod contr aadA kann in beide *IR* inserieren. **c)**: Southern-Analyse. Gezeigt sind die Linien 337-1 und 337-10, die homoplastomisch *aadA* integriert haben.

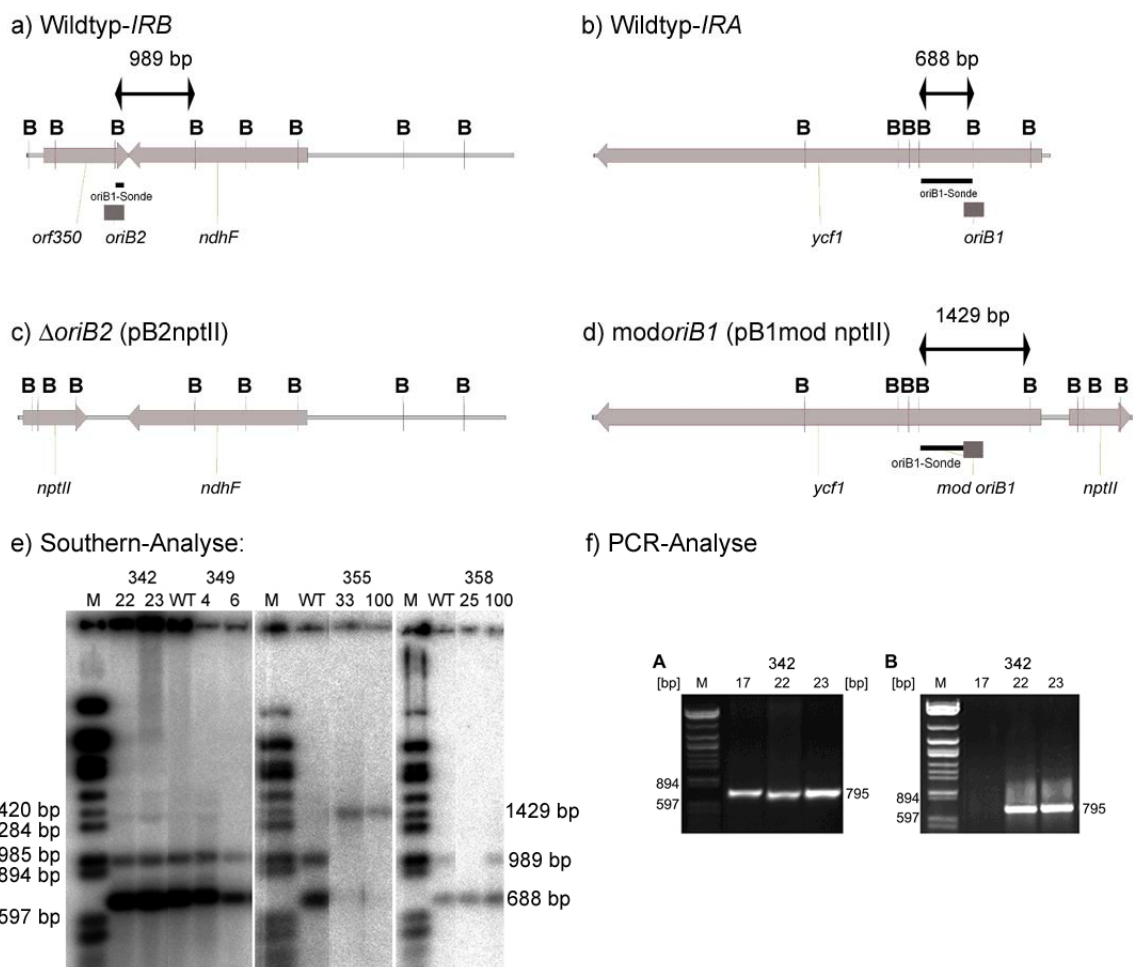
Die *aadA*-Kassette wurde gegen die oben beschriebene *nptII*-Kassette (s. V.1.1.2) ausgetauscht, um den Vektor für Übertransformtionen von bereits existierenden, *aadA* enthaltenden Linien (Mühlbauer et al., 2002) benutzen zu können. Dieser Austausch erfolgte durch das Ausschneiden der *nptII*-Kassette mit *XhoI* und *Acc65I* aus dem Vektor pKCZnptII (s. Abb. IV-11) und Insertion der Kassette in den mit gleichen Restriktionsenzymen geschnittenen pB1mod contr *aadA*-Vektor (s. Abb. IV-15) (pB1mod contr *nptII*, s. Abb. IV-16). Die mutierte *oriB1*-Sequenz, bestehend aus den Primern p220 und p221, wurde mittels PCR amplifiziert, mit *BamHI* geschnitten und



in den ebenfalls mit *BamHI*-geschnittenen pB1mod contr *nptII* eingefügt. Der fertige Vektor pB1mod *nptII* (s. Abb. V-12) wurde für folgende Ansätze verwendet:

- Transformation des Wildtyps (Transformation 342)
- Transformation der $\Delta oriA$ -Linie 282-14 (Transformationen 344 und 349)
- Transformation der $\Delta oriB2$ -Linie 273-41 (Transformation 348)
- Ko-Transformation des Wildtyps mit pB2nptII (Transformation 355)
- Ko-Transformation der $\Delta oriA$ -Linie 282-14 mit pB2nptII (Transformation 358)

Das Problem dieser Ansätze besteht darin, dass die Insertion des Selektionsmarkers auch nur mit Hilfe eines Teils der 2 kb-Insertionsflanke erfolgen kann, so dass die mutierte *oriB1*-Sequenz nicht notwendigerweise eingebaut wird. Bei der Transformation des Wildtyps (Transformation 342) konnte die mutierte Sequenz in selektierten, resistenten Linien nur in neun von 23 Fällen (39%) nachgewiesen werden. Nach der dritten Wiederholung der Regeneration in Gegenwart von Selektionsdruck konnte nur noch in fünf Linien (22%) die mutierte Sequenz mittels PCR detektiert werden (siehe Abb. V-13 f).

Abbildung V-13 PCR- und Southern-Analysen: Nachweis der mutierten *oriB1*-Sequenz

Southern-Analyse: Verdau der Gesamt-DNA mit *Bse*LI (B). Nachweis mit *oriB1*-Sonde. Als Marker diente λ *Eco47I*, und als Negativkontrolle wurde DNA des Wildtyps (WT) von *Nicotiana tabacum* verwendet. **a)/b)**: Schemata der Wildtyp-Situation, die auch der Situation in Δ *oriA*-Linien entspricht. **c)**: Schema des *IR_B* nach Deletion des *oriB2* mittels Transformation mit pB2nptII. **d)**: Schema des *IR_A* nach Mutagenese des *oriB1* mittels Transformation mit pB1mod nptII. **e)**: Southern-Analyse. Gezeigt sind die Linien 342-22, 342-23, 349-4, 349-6, 358-25 und 358-100, die keine Integration der mutierten *oriB1*-Sequenz (*modoriB1*) zeigen. 355-33 und 355-100 haben die mutierte *oriB1*-Sequenz integriert und sind – wie 358-25 – auch Δ *oriB2*, da die *oriB2*-989 bp-Bande fehlt. 355-33 und 355-100 sind also *modoriB1*/ Δ *oriB2*.

PCR-Analyse: **f)**: Nachweis der mutierten *oriB1*-Sequenz (*modoriB1*) mittels der Primer p220 und p316 in selektierten Linien (A) und nach der dritten Wiederholung der Selektion (B). Verwendet wurde der λ *Eco47I*-Marker (M). Getestet wurden die Linien 342-17, 342-22 und 342-23. In der Linie 342-17 ist nach der dritten Wiederholung der Selektion die mutierte *oriB1*-Sequenz nicht mehr nachweisbar, während sie in den anderen beiden Linien noch detektierbar ist.

Eine Southern-Analyse zeigte aber, dass nur Wildtyp-*oriB1*-Kopien nachweisbar waren (s. Abb. V-13 b, d, e, Transformation 342). Nach Übertransformation von Δ *oriA*-Linien (Transformationen 344 und 349) wurden von 30 Linien keine gefunden, die homoplastomisch für die mutierte *oriB1*-Sequenz waren (s. Abb. V-13 b, d, e, Transformation 349), obwohl mittels PCR mutierte Sequenzen gefunden wurden (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu konnten bei einer Übertransformation einer Δ *ori*-

B2-Linie (Transformation 348) und einer Ko-Transformation des Wildtyps mit pB1modnptII und pB2nptII (Transformation 355) homoplastomische Linien erhalten werden: eine von zwölf (8,3%) bzw. drei von 27 (11,1%) (s. Abb. V-13 a-e, Transformation 355). Die *oriB1*-Sequenz konnte mit diesem Ansatz nur mutiert werden, wenn entweder die *oriB2*-Sequenz bereits deletiert war oder mittels einer Ko-Transformation parallel deletiert wurde. Es ist also möglich, gleichzeitig *oriB1* stark zu mutieren und *oriB2* zu deletieren.

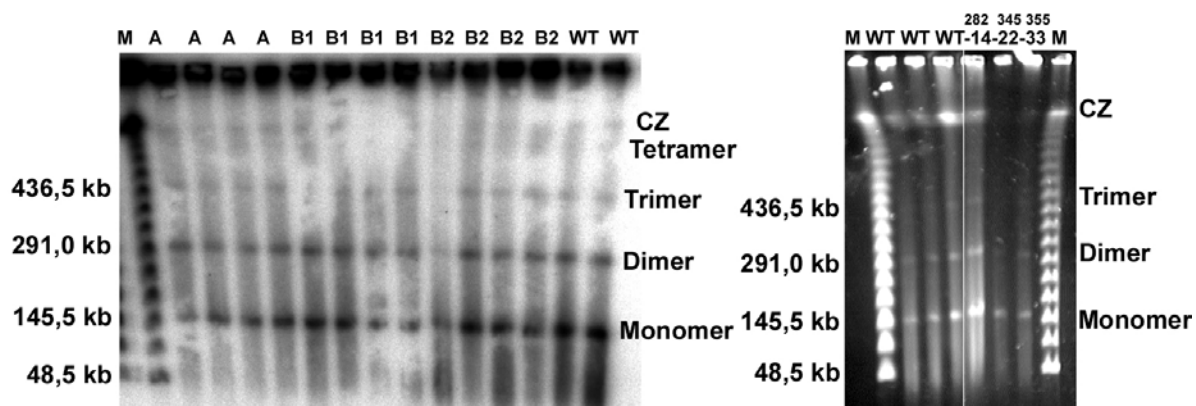
V.1.3. Ansätze für die Entfernung aller *oriA*- und *oriB*-Kopien

Bei einer Ko-Transformation mit pB1modnptII und pB2nptII einer Δ *oriA*-Linie (Transformation 358) konnte in 18 von 18 Linien die *oriB1*-Sequenz nicht mutiert werden. In elf von 18 Linien (61%) konnte aber der *oriB2* deletiert werden (siehe Abb. V-13 a-e, Transformation 358). Es war also bisher nicht möglich, Linien herzustellen, in denen der *oriB1* mutiert und die *oriB2*, *oriA1* und *oriA2* deletiert waren.

V.2. Analyse des Wildtyps und der Deletionslinien mittels PFGE

V.2.1. Struktur des Plastoms *in vivo*

PFGE-Analysen des Wildtyps von *Nicotiana tabacum* zeigen, dass Moleküle mit Monomer-, Dimer-, Trimer- und Tetramergröße vorliegen, größere Moleküle, die nicht aufgetrennt wurden, sowie ein "Schmier" linearer Moleküle, die kleiner als das Monomer sind. Da die Moleküle der Größe des Monomers oder eines Vielfachen des Monomers im Vergleich zu den linearen Marker-Molekülen genau auf der erwarteten Höhe laufen, sind diese Moleküle linear. Zirkuläre Moleküle würden entweder in der *supercoiled*-Konformation weiter als die erwartete Größe oder als offene Zirkel oberhalb der erwarteten Größe laufen. Ein beträchtlicher Anteil der plastidären DNA verbleibt in den Taschen. Zwischen Wildtyp und Linien mit deletierten bzw. mutierten Replikationsursprüngen war kein Unterschied feststellbar. Untersucht wurden Δ *oriA*-, Δ *oriB1*- (heteroplastomisch), Δ *oriB2*- und Δ *oriA*/ Δ *oriB2*-Linien sowie Linien, deren *oriB1* mutiert und *oriB2* deletiert waren. Damit konnten keine Auswirkungen der Deletion bzw. Mutagenese von Replikationsursprüngen auf die Struktur der plastidären DNA nachgewiesen werden (siehe Abb. V-14).

Abbildung V-14 PFGE-Analyse der ptDNA von *Nicotiana tabacum***Pulsfeldgelelektrophoresen:**

Links Analyse von $\Delta oriA$ - (**A**), $\Delta oriB1$ - (**B1**, heteroplastomisch!) und $\Delta oriB2$ -Linien (**B2**) (Mühlbauer et al., 2002) sowie Wildtyp (**WT**). Southern-Analyse mit pTB18-Sonde.

Rechts Analyse von $\Delta oriA$ - (**282-14**), $\Delta oriA/\Delta oriB2$ - (**345-22**) und $\Delta oriB1/\Delta oriB2$ -Linien (**355-33**) sowie Wildtyp (**WT**). Mit Ethidiumbromid gefärbt.

Marker: λ -PFGE-Marker (NEB, Frankfurt/Main). Kontinuierlicher Gradient über 24 h von 60 s bis 0,1s.

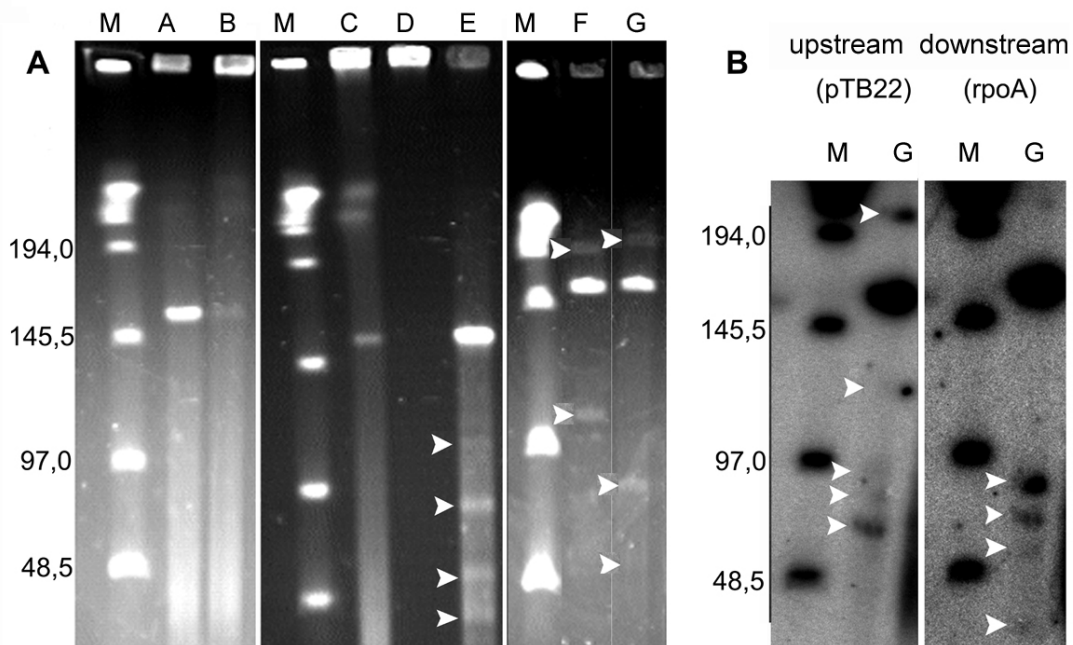
CZ = *compression zone*, d.h. der Bereich, in dem nicht mehr aufgetrennt wird.

V.2.2. Charakterisierung der Enden von linearen oder teilweise linearen ptDNA-Molekülen

Um die Enden der detektierten linearen Moleküle zu untersuchen, wurde die ptDNA mit Restriktionsenzymen – *FspAI*, *SfiI* oder *SgrAI* - geschnitten, deren Schnittstelle nur einmal im Plastom vorkommt. Diese Methode haben Oldenburg & Bendich (2004a) bei *Zea mays* etabliert. Bei *Nicotiana tabacum* ist eine starke Anreicherung der Monomer-Bande zu beobachten, aber Banden unterhalb der Größe des Monomers konnten wegen des starken „Schmiers“ nicht detektiert werden (siehe Abb. V-15, Spur A). Deshalb erfolgte eine Entfernung des „Schmiers“ mittels einer Prä-Elektrophorese, wobei auch alle linearen Mono- und Multimere entfernt werden (siehe Abb. V-15, Spur D). Danach konnten sowohl diskrete Banden unterhalb der Größe des Monomers, als auch Banden zwischen der Monomer- und Dimergröße detektiert werden, und die Monomer-Bande lag erneut angereichert vor (siehe Abb. V-15, Spuren E, F, G). Die detektierten Banden wurden zur Kartierung der Enden verwendet. Mittels Southern-Analyse, bei der Sonden verwendet wurden, die 5' oder 3' der Restriktionsschnittstelle binden, wurde ermittelt, wo das Ende relativ zu der Position der Schnittstelle ist. Zum Beispiel wurde pTB22 als 3'-Sonde und *rpoA* als 5'-Sonde für mit *SgrAI*-geschnittene Fragmente verwendet (siehe Abb. V-15B, Abb. V-16). Um die Position des Endes kartieren zu können, wurde entsprechend die Fragmentgröße zu der Position der Schnittstelle addiert oder subtrahiert. Als Grundlage diente die

veröffentlichte Sequenz des Plastoms von *Nicotiana tabacum* (Shinozaki et al., 1986, Yukawa et al., 2005, NC_001879). Die Kartierung wurde mit zusätzlichen Sonden für die SSC (*ndhD*) und IR (*ycf2*) überprüft.

Abbildung V-15 Kartierung der Enden mittels PFGE und Southern-Analysen



A: Pulsfeldgelelektrophorese des Wildtyps: **M** = λ PFGE-Marker (NEB), **A** = Restriktion mit *SgrAI* ohne Prä-Elektrophorese, **B/C** = unbehandelte ptDNA, **D** = mit Prä-Elektrophorese, **E** = Restriktion mit *SfiI* mit Prä-Elektrophorese, **F** = Restriktion mit *FspAI* mit Prä-Elektrophorese, **G** = Restriktion mit *SgrAI* mit Prä-Elektrophorese, Pfeil = analysierte Bande. Gele mit Ethidiumbromid gefärbt.

B: Southern-Analyse des Wildtyps: **F** = Restriktion mit *SgrAI* mit Prä-Elektrophorese, **pTB22** = Sonde, um Fragmente zu detektieren, die stromaufwärts (*upstream*) der Position der Restriktionschnittstelle von *SgrAI* in der Plastom-Sequenz liegen, **rpoA** = Sonde, um Fragmente zu detektieren, die stromabwärts (*downstream*) der Position der Restriktionschnittstelle von *SgrAI* in der Plastom-Sequenz liegen, Pfeil = analysierte Bande.

Banden ähnlicher Größe, die mit den gleichen Sonden detektiert wurden, aber aus unabhängigen Experimenten stammten, wurden in Klassen zusammengefasst (siehe Tab. V-1). Wenn das detektierte Ende einem Replikationsursprung entspricht, kann die Orientierung des Endes relativ zur Restriktionsschnittstelle auf die Richtung der Replikation hinweisen. Die Replikation würde an dem Replikationsursprung initiiert und in Richtung der Schnittstelle fortgesetzt werden. Ein Ende, dessen Bande mit den 5'-Sonden detektiert wurde, würde auf eine Replikation in 3'-Richtung relativ zur Position 0 der publizierten Sequenz hindeuten.

Die relative Intensität der Banden konnte nicht quantifiziert werden, da der auch beim Schneiden mit einem Restriktionsenzym entstehende „Schmier“ einen zu starken Hintergrund bildet, der außerdem keine gleichmäßige Intensität besitzt.

Die Banden mit einer Größe zwischen der des Monomers und des Dimers (siehe Abb. V-15 Spuren F, G) können entweder interne Fragmente von linearen oder zirkulären Multimeren sein, die *head-to-head* bzw. *tail-to-tail* verknüpft sind (siehe Abb VI-1 A, I) oder *head-to-tail* verknüpfte Multimere, deren *single copy*-Regionen in entgegengesetzter Orientierung vorliegt. Diese Konformation wurde von Palmer (1983) als *flipping* bezeichnet (siehe Abb VI-1 B, D). Die erwartenden Banden für das ‚geflippte‘ *head-to-tail* verknüpfte Multimer sind 109 kb und 203 kb (geschnitten mit *FspAI*), 154 kb und 157 kb (mit *SfiI*) und 86 kb und 226 kb (mit *SgrAI*). Die Klassen Fs2 und Fs3 bzw. Sg8 und Sg12 (Tab. V-1) entsprechen den erwarteten Größen. An diese Banden binden auch nur die Sonden, die zu erwarten sind (z.B. alle verwendete Sonden außer *rpoA* im Falle von Sg12). Die Banden der Restriktion mit *SfiI* entsprechen in etwa der Größe des Monomers, so dass sie nicht extra detektierbar sind. Deshalb sind die Banden, die größer als das Monomer, aber kleiner als das Dimer sind, interne Fragmente von ‚geflippten‘ *head-to-tail* verknüpften Multimeren. Die Banden Fs2, Fs3, Sg8 und Sg12 (Tab. V-1) wurden von der Kartierung ausgeschlossen, da sie interne Fragmente der ‚geflippten‘ *head-to-tail* verknüpften Multimere sind. Diese Banden hatten eine deutlich stärkere Intensität als die anderen Banden unterhalb der Monomer-Größe.

Die gemessene Größe des Monomers wurde mit der Größe, die in der Literatur (Shinozaki et al., 1986, Yukawa et al., 2005, NC_001879) gefunden wurde, verglichen. Die Standardabweichung war 3,6 kb, und die größte absolute Abweichung betrug 9,7 kb. Die Enden können deshalb höchstens mit einer Genauigkeit von 3,6 kb kartiert werden. Unter den gewählten PFGE-Bedingungen wurden Fragmente zwischen 30 kb und 190 kb linear aufgetrennt. Die Grundlage der Kartierung der Enden von linearer oder teilweise linearer Wildtyp-ptDNA waren 75 einzelne Fragmente aus 16 unabhängigen Experimenten, die sich in der Größe von Monomeren und Multimeren unterschieden. Diese Fragmente wurden abhängig von der Größe und der Detektion durch Sonden zu 29 Klassen in Tabelle V-1 zusammengefasst, wobei angenommen wurde, dass jede Klasse eine individuelle Sequenz repräsentiert. Die Einteilung der Fragmente in Klassen ist allerdings abhängig von der Messungengenauigkeit. Deshalb könnten die Enden mehrerer Klassen unter Berücksichtigung der Standardabweichung mit einer Position auf dem Plastom korrelieren. Zwei Fragmente können auch dann Enden auf der gleichen Position besitzen, wenn die beiden Fragmente zusam-

men ein Monomer bilden. Die Fragment-Klassen Sf2 und Sf14 bilden zum Beispiel zusammen ein Monomer, und die Enden liegen auf der gleichen Position.

Tabelle V-1 Enden von linearen oder teilweise linearen Molekülen

Enzym	Position	Größe	s	Anzahl Funde	Mögliche Orientierung Replikation	pTB22 (LSC)	pTB7 (LSC)	Sonden rpoA (LSC)	ndhD (SSC)	ycf2 (SSC)
FspAI										
Fs1	106,646	69,125	0,36	3	<i>Downstream</i>				J	
Fs2		102,811	1,29	4			J		J	J
Fs3		198,310	1,42	3			J		J	J
SfiI										
Sf1	12,804	29,680		1	<i>Downstream</i>		J			
Sf2	2,428	40,055		1	<i>Downstream</i>		J			
Sf3	85,830	41,793	2,92	2	<i>Upstream</i>	J		J		
Sf4	93,086	50,603	3,24	4	<i>Upstream</i>	J				J
Sf5	146,783	51,639	2,19	3	<i>Downstream</i>		J			J
Sf6	104,309	60,809	1,80	2	<i>Upstream</i>	J		J		
Sf7	133,080	65,342	3,64	2	<i>Downstream</i>		J			
Sf8	117,396	81,026		1	<i>Downstream</i>		J			
Sf9	133,933	90,996	0,94	3	<i>Upstream</i>	J		J	J	J
Sf10	107,014	91,302	0,48	4	<i>Downstream</i>		J		J	J
Sf11	100,144	98,278	0,90	3	<i>Downstream</i>		J			
Sf12	141,039	98,407	0,21	1	<i>Upstream</i>	J		J		
Sf13	83,176	115,246	1,51	3	<i>Downstream</i>		J		J	
Sf14	2,472	115,401	1,28	2	<i>Upstream</i>	J		J	J	
SgrAI										
Sg1	107,090	28,566	1,08	2	<i>Upstream</i>			J		J
Sg2	121,577	43,053		1	<i>Upstream</i>			J		
Sg3	29,712	48,500	0,44	1	<i>Downstream</i>	J	J			
Sg4	136,385	57,861	2,19	5	<i>Upstream</i>			J	J	
Sg5	8,791	69,852	0,96	2	<i>Downstream</i>	J	J			
Sg6	148,836	70,312	0,68	2	<i>Upstream</i>			J		
Sg7	151,575	83,033	1,95	2	<i>Downstream</i>	J	J			
Sg8		85,731	1,15	7				J	J	J
Sg9	16,389	93,804		1	<i>Upstream</i>			J		
Sg10	138,970	96,460	4,91	4	<i>Downstream</i>	J	J			
Sg11	115,022	119,441		1	<i>Downstream</i>	J				
Sg12		212,401	6,38	5		J	J		J	J

75 einzelne Fragmente, die mittels Southern-Analysen von PFGE-Gelen gefunden wurden, sind zu 29 Klassen kombiniert. Die Angehörigen einer Klasse haben eine ähnliche Größe und wurden von den gleichen Sonden detektiert. Es wird angenommen, dass eine Klasse die gleiche DNA-Sequenz darstellt. Fragment-Klassen ohne Position in der Plasmidsequenz sind interne Teile von Multimeren. Die Richtung der Replikation beruht auf der Annahme, dass die Enden Replikationsursprünge sind und ein σ -Replikationsmechanismus benutzt wird. s = Standardabweichung. J = Fragment detektiert.

Die Enden wurden mittels der publizierten Sequenz (Shinozaki et al., 1986, Yukawa et al., 2005, NC_001879) kartiert. Die Position der Enden der Fragment-Klassen sind in Abb.V-16A dargestellt. Da auch Fragmente gefunden wurden, deren *single copy*-Regionen ‚geflippt‘ waren, wurden die kartierten Positionen in einem *inverted repeat*

auf den jeweils anderen übertragen (siehe Abb. V-16B). Die Mehrzahl der Enden wurde in die *inverted repeat* kartiert, ein kleinerer Anteil in die *single copy*-Regionen (siehe Abb. V-16). Die Verteilung der Enden der 75 Fragmente und der 29 Fragment-Klassen ist in Tabelle V-2 gezeigt. Unter Berücksichtigung der Standardabweichung gibt es eine eindeutige Korrelation von kartierten Enden mit den beiden Kopien von *oriA*, aber eine schwächere Korrelation mit den *oriB* (siehe Tab. V-2, Zeilen 1 und 2). Ohne *flipping* wurde nur ein Ende eines Fragments zu *oriB2* kartiert. Wenn aber *flipping* eingerechnet wurde, war die Anzahl der Enden, die zu beiden *oriB* kartiert wurden, ähnlich (siehe Tab. V-2, Zeilen 3 und 4).

Tabelle V-2: Korrelation der kartierten Enden von linearen oder teilweise linearen ptDNA-Molekülen mit bekannten Replikationsursprüngen bzw. deren Lokalisation in den *inverted repeats* und *single copy*-Regionen.

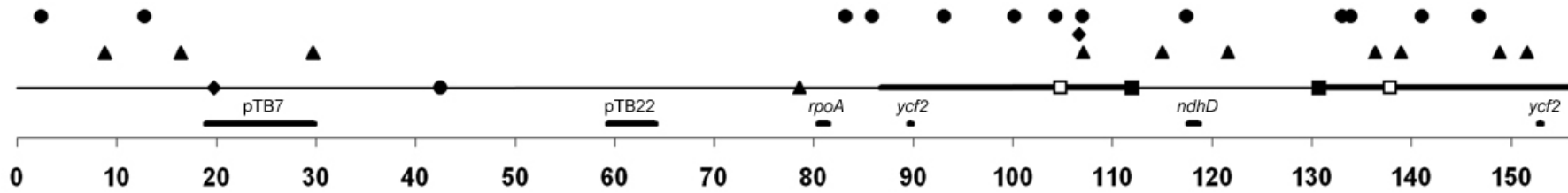
		Ohne <i>flipping</i>		Inklusive <i>flipping</i>	
		Standard- abweichung	Größte absolute Abweichung	Standard- abweichung	Größte absolute Abweichung
1	<i>oriA1 (IR_A)</i>	9 (3)	17 (6)	21 (7)	32 (11)
2	<i>oriA2 (IR_B)</i>	12 (4)	15 (5)	21 (7)	32 (11)
3	<i>oriB1 (IR_A)</i>	5 (2)	12 (5)	5 (2)	23 (9)
4	<i>oriB2 (IR_B)</i>	1 (1)	13 (6)	6 (3)	24 (10)
5	<i>Oenothera oriA (IR_A)</i>	6 (2)	20 (7)	10 (3)	36 (13)
6	<i>Oenothera oriA (IR_B)</i>	5 (2)	16 (6)	11 (4)	36 (13)
7	Suspensionskultur (<i>IR_A</i>)	10 (3)	15 (5)	20 (7)	29 (10)
8	Suspensionskultur (<i>IR_B</i>)	10 (3)	16 (7)	19 (6)	32 (12)
9	<i>rpl16 (LSC)</i>	5 (2)	7 (3)	5 (2)	13 (5)
10	LSC nahe <i>IR_A</i>	11 (5)	17 (8)	13 (8)	21 (16)
11	<i>IR_A</i>	26 (10)	31 (12)	45 (16)	51 (18)
12	<i>IR_B</i>	23 (9)	26 (11)	46 (17)	49 (19)
13	LSC	17 (8)	25 (12)	21 (8)	37 (16)
14	SSC	8 (5)	25 (11)	13 (7)	47 (19)

Die Zahl der detektierten Fragmente ist angegeben, in Klammer die Zahl der Fragment-Klassen.

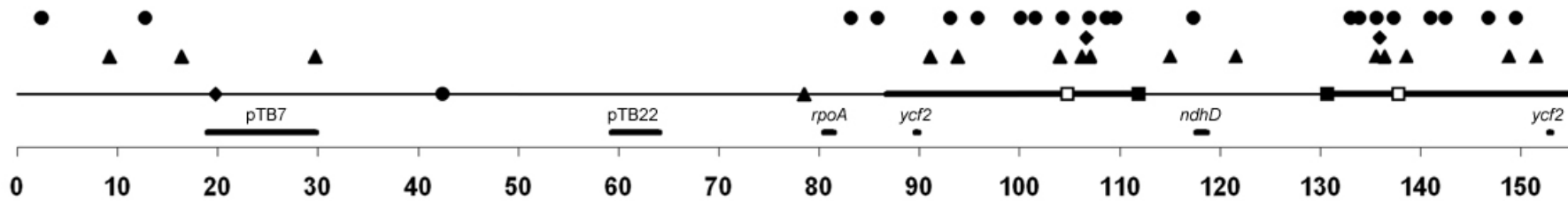
Neben den Enden, deren Position mit bekannten Replikationsursprüngen korreliert, wurden zusätzliche Enden kartiert. Die Enden von acht Fragment-Klassen wurden in die LSC kartiert – meist nahe den Grenzen zu den *inverted repeats*, zwei in die SSC und jeweils fünf in die *inverted repeats* (*flipping* einberechnet, s. Abb. V-16B). Selbst wenn man die größte absolute Abweichung berücksichtigt, finden sich Enden von acht Fragment-Klassen ohne Korrelation mit den bekannten Ori in der LSC und je drei in den *inverted repeats*.

Abbildung V-16 Position der Enden

A: Kartierte Enden von linearen oder teilweise linearen ptDNA-Molekülen - ohne *flipping*



B: Kartierte Enden von linearen oder teilweise linearen ptDNA-Molekülen - inklusive *flipping*



- | | | | |
|-----------------------------|--|--|---|
| ◆ = <i>FspAI</i> (19832 bp) | ◆ = Ende eines <i>FspAI</i> -Fragments | ◻ = <i>oriA2</i> : 105 kb, <i>oriA1</i> : 138 kb | — = <i>LSC</i> : 0 kb - 87 kb, <i>SSC</i> : 112 kb - 131 kb |
| ● = <i>SfiI</i> (42483 bp) | ● = Ende eines <i>SfiI</i> -Fragments | ■ = <i>oriB2</i> : 112 kb, <i>oriB1</i> : 131 kb | — = <i>IRB</i> : 87 kb - 112 kb, <i>IRA</i> : 131 kb - 156 kb |
| ▲ = <i>SgrAI</i> (78524 bp) | ▲ = Ende eines <i>SgrAI</i> -Fragments | <i>rpoA</i> = Sonde für Southern-Analyse | — = Position in der publizierten Plastomsequenz in kb |
- 110**

Kartierte Enden von linearen oder teilweise linearen ptDNA-Molekülen. Gezeigt werden die Positionen der Fragment-Klassen in Tab. V-1 ohne (A) und inklusive *flipping* (B). Die Position bezieht sich auf die Sequenz des Plastoms von *Nicotiana tabacum* (NC_001879).

V.2.3. Kartierung von Enden linearer Moleküle in Linien mit inaktivierten Ori

Bei $\Delta oriA$ -Linien wurde begonnen, ebenfalls die Enden linearer oder teilweise linearer Moleküle zu kartieren (s. Abb. V-17). Bisher stehen bei $\Delta oriA$ -Linien aber nur Ergebnisse von mit Ethidiumbromid-gefärbten Gelen und keine Southern-Analysen zur Verfügung. Das bedeutet, es konnte nicht unterschieden werden, wie die Orientierung des Fragments relativ zur Schnittstelle ist. Deshalb ergibt eine Bande zwei mögliche Positionen im Plastom. Dieses Problem wird aber dadurch abgemildert, dass beim *flipping* sowieso angenommen werden muss, dass sich auf beiden Positionen, wenn diese innerhalb oder nahe den *inverted repeats* liegen, ein Ende eines Moleküls befindet. Tatsächlich wurden in $\Delta oriA$ -Linien ebenfalls die internen Fragmente von ‚geflippten‘ *head-to-tail* Multimeren gefunden (Fs2, Fs3, Sg8 und Sg12, siehe Tab. V-3), das heißt die Deletion der *oriA* hat auch in dieser Beziehung keine Auswirkungen, und auch hier muss bei der Analyse das *flipping* berücksichtigt werden.

In diesen Linien wurden bei fünf Experimenten 23 Fragmente gefunden, die 15 der 29 beim Wildtyp detektierten Klassen entsprachen. Dazu wurden zwei neue Klassen detektiert (Sf Δ 1 und Sf Δ 2, siehe Tab. V-3 und Abb. V-18). Die Daten der Restriktion mit *SgrAI* sind allerdings

bisher nur eingeschränkt aussagekräftig, da bisher nur die internen Fragmente der *head-to-tail* verknüpften Multimere mit ‚geflippten‘ *single copy*-Regionen gefunden wurden. Nach der Restriktion mit *FspAI* wurden drei von drei beim Wildtyp gefundenen Klassen detektiert, mit *SfiI* waren es zehn von 14 Klassen plus zwei beim Wildtyp nicht vorgefundene Klassen.

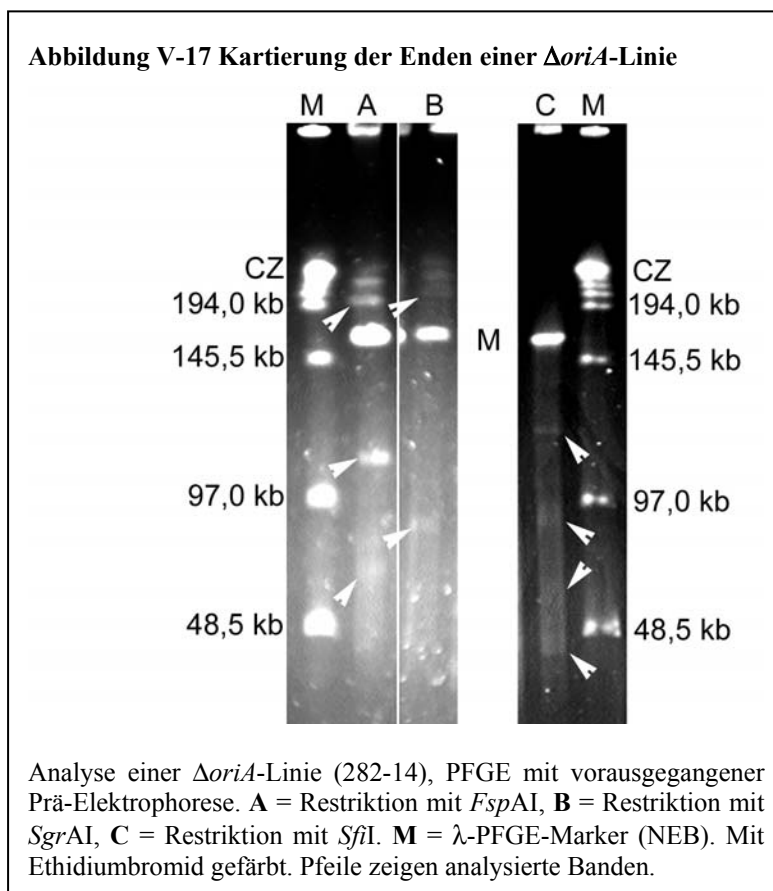


Tabelle V-3 Fragment-Klassen einer $\Delta oriA$ -Linie (282-14)

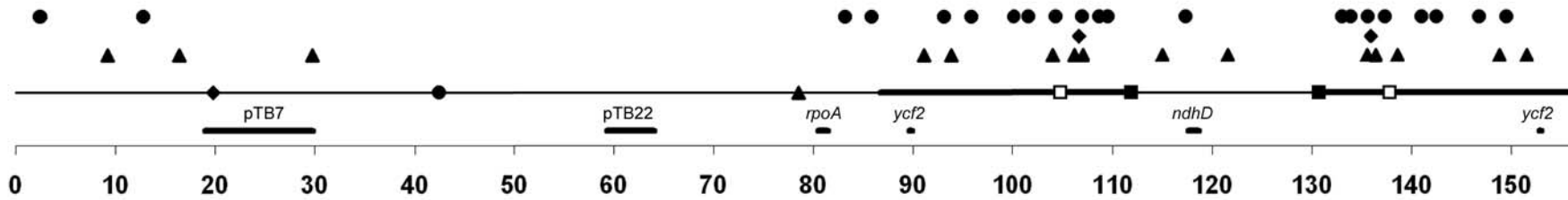
Enzym	Größe	Standard- abweichung	Anzahl Funde	Position (<i>downstream</i>)	Position (<i>upstream</i>)
<i>FspAI</i>					
Fs1	73,132		1	92,964	103,379
Fs2	105,494		1		
Fs3	197,233		1		
<i>SfiI</i>					
Sf2, Sf3	41,676	3,258	4	84,159	0,808
Sf6, Sf7	64,470		1	106,953	134,692
Sf9-12	93,285	1,666	5	135,768	105,877
Sf Δ 1	109,246	0,841	2	151,729	89,917
Sf13, Sf14	116,221	2,639	3	2,025	82,941
Sf Δ 2	136,191	1,390	2	21,995	62,971
<i>SgrAI</i>					
Sg8	87,974	0,427	2		
Sg12	208,713		1		

23 Fragmente, die nach Restriktion mit *FspAI*, *SfiI* oder *SgrAI* und Auftrennung mit PFGE gefunden wurden, wurden in elf Klassen zusammengefasst. Es sind jeweils beide Positionen auf der Plasmid-Sequenz relativ (*upstream/downstream*) zu der Restriktionsschnittstelle angegeben. Die Daten beruhen nur auf mit Ethidiumbromid gefärbten Gelen. Banden ohne angegebene Position (Fs2, Fs3, Sg8, Sg12) sind interne Fragmente von *head-to-tail* verknüpften Multimeren mit ‚geflippten‘ *single copy*-Regionen.

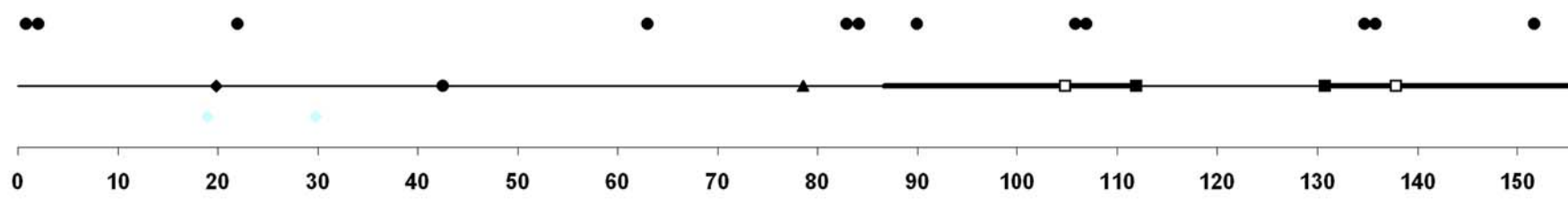
Um die Auswirkungen der Deletion der *oriA* durch einen Vergleich mit dem Wildtyp zu untersuchen, wurden nur die Fragmente berücksichtigt, die durch Restriktion mit *SfiI* erhalten wurden. Die Schnittstelle dieses Enzyms liegt symmetrisch zu den *inverted repeats*, so dass die beiden Orientierungen, die das Fragment relativ zur Restriktionsstelle haben kann, den beiden Möglichkeiten beim *flipping* entsprechen. Die beiden anderen verwendeten Schnittstellen liegen asymmetrisch zu den *inverted repeats*, weshalb hier eine Southern-Analyse für die Auswertung nötig gewesen wäre. Da diese noch nicht vorlag, wurden die Fragmente, die nach Restriktion mit *FspAI* oder *SgrAI* detektiert wurden, von der Analyse ausgeschlossen.

Abbildung V-18 Vergleich der kartierten Enden des Wildtyps und einer $\Delta oriA$ -Linie

A: Kartierte Enden von linearen oder teilweise linearen ptDNA-Molekülen beim Wildtyp



B: Kartierte Enden von linearen oder teilweise linearen ptDNA-Molekülen bei einer $\Delta oriA$ -Linie



- ◆ = *FspAI* (19832 bp) ◆ = Ende eines *FspAI*-Fragments □ = *oriA2*: 105 kb, *oriA1*: 138 kb — = *LSC*: 0 kb - 87 kb, *SSC*: 112 kb - 131 kb
- = *SfiI* (42483 bp) ● = Ende eines *SfiI*-Fragments ■ = *oriB2*: 112 kb, *oriB1*: 131 kb — = *IRB*: 87 kb - 112 kb, *IRA*: 131 kb - 156 kb
- ▲ = *SgrAI* (78524 bp) ▲ = Ende eines *SgrAI*-Fragments *rpoA* = Sonde für Southern-Analyse — = Position in der publizierten Plastomsequenz in kb

110

Kartierte Enden von linearen oder teilweise linearen ptDNA-Molekülen beim Wildtyp (A) und einer $\Delta oriA$ -Linie (B). Gezeigt werden die Positionen der Fragment-Klassen in Tab. V-1 und Tab. V-3 (nur inklusive *flipping*). Bei der $\Delta oriA$ -Linie wurden nur Fragmente berücksichtigt, die nach Restriktion mit *SfiI* gefunden wurden. Die Position bezieht sich auf die Sequenz des Plastoms von *Nicotiana tabacum* (NC_001879).

Die Häufigkeit, mit der Enden von linearen bzw. teilweise linearen DNA-Molekülen an der Position der *oriA* und des Replikationsursprungs in Suspensionskulturen (Takeda et al., 2002) gefunden wurde, beträgt bei den $\Delta oriA$ -Linien nur 71,4% und 85,7% bzw. 75,0% und 78,9% des Niveaus beim Wildtyp (siehe Tab. V-4, Zeile 1, 2, 7, 8). Allerdings ist hier die Auflösung bei PFGE zu gering, um zwischen *oriA* und dem Replikationsursprung in Suspensionskulturen zu unterscheiden. Im Gegensatz dazu wurden bei den $\Delta oriA$ -Linien deutlich weniger Enden an der Position der *oriB* (60% bzw. 0%, Tab. V-4, Zeile 3, 4) und *Oenothera-oriA* (0 bzw. 54,5%, Tab. V-4, Zeile 6, 6) gefunden, während die Zahl der Funde von Enden in der LSC in der Nähe der *IR* auf 184,6% bzw. 420% anstieg (siehe Tab. V-4, Zeile 9, 10).

Tabelle V-4 Verteilung der Enden bei einer $\Delta oriA$ -Linie im Vergleich zum Wildtyp

		Inklusive <i>flipping</i>		% $\Delta oriA$	% (WT)	Anzahl bei $\Delta oriA$ in % der Zahl beim Wildtyp
		Standard-abweichung	Größte absolute Abweichung			
1	<i>oriA1 (IR_A)</i>	5 (2)	6 (2)	14,7	20,6	71,4
2	<i>oriA2 (IR_B)</i>	6 (2)	6 (2)	17,6	20,6	85,7
3	<i>oriB1 (IR_A)</i>	1 (0)	6 (2)	2,9	4,9	60,0
4	<i>oriB2 (IR_B)</i>	0 (0)	6 (2)	0,0	5,9	0,0
5	<i>Oenothera oriA (IR_A)</i>	0 (0)	7 (2)	0,0	9,8	0,0
6	<i>Oenothera oriA (IR_B)</i>	2 (0)	6 (2)	5,9	10,8	54,5
7	Suspensionskultur (<i>IR_A</i>)	5 (2)	6 (2)	14,7	19,6	75,0
8	Suspensionskultur (<i>IR_B</i>)	5 (2)	6 (2)	14,7	18,6	78,9
9	<i>rpl16 (LSC)</i>	7 (2)	9 (3)	20,6	4,9	420,0
10	LSC nahe <i>IR_A</i>	8 (3)	9 (3)	23,5	12,7	184,6
11	<i>IR_A</i>	13 (5)	15 (5)	38,2	25,5	150,0
12	<i>IR_B</i>	12 (4)	15 (5)	35,3	22,5	156,5
13	LSC	20 (7)	22 (8)	58,8	16,7	352,9
14	SSC	1 (0)	12 (4)	2,9	7,8	37,5

Die Zahl der detektierten Fragmente ist angegeben, in Klammer die Zahl der Fragment-Klassen. Berücksichtigt wurden nur die Fragmente, die nach Restriktion mit *SfiI* erhalten wurden. Daneben welche Prozentzahl der Fragmente bei der $\Delta oriA$ -Linie (% $\Delta oriA$) und beim Wildtyp (% WT), unter Berücksichtigung des ‚flipping‘ und der Standardabweichung, an welcher Position gefunden wurde. Die letzte Spalte zeigt die Veränderung der Anzahl bei der $\Delta oriA$ -Linie in % zu der Anzahl beim Wildtyp.

Dazu wurden zusätzliche Enden im LSC gefunden (s. Sf Δ 1 und Sf Δ 2, siehe Tab. V-3). Die bisherigen Ergebnisse deuten also darauf hin, dass die Deletion der *oriA* Auswirkungen auf die Verteilung der Enden der plastidären DNA hat. Dies kann wiederum durch eine unterschiedliche Nutzung von Replikationssprüngen bedingt sein.

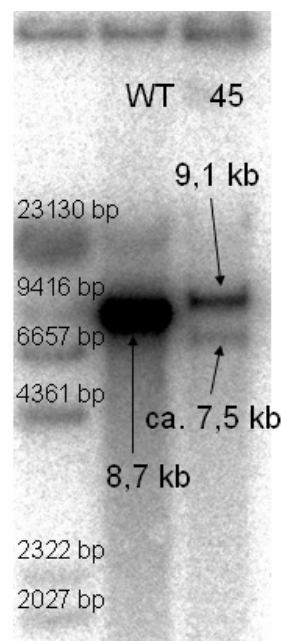
V.2.4. Kartierung von Enden linearer Moleküle mittels Southern-Analyse

Neben der Kartierung der Enden mittels PFGE wurden auch erste entsprechende Experimente mittels Southern-Analysen durchgeführt. In $\Delta oriA$ - und $\Delta oriA/\Delta oriB2$ -Linien wurde ein Ende nahe der 23S rRNA gefunden, was der Region entspricht, in der in Suspensionskulturen von *Nicotiana tabacum* ein putativer Replikationsursprung beschrieben wurde (Takeda et al., 1992) (siehe Abb. V-19). Diese Methode könnte zur Feinkartierung der neu kartierten Enden verwendet werden.

V.2.5. Entwicklungsabhängigkeit

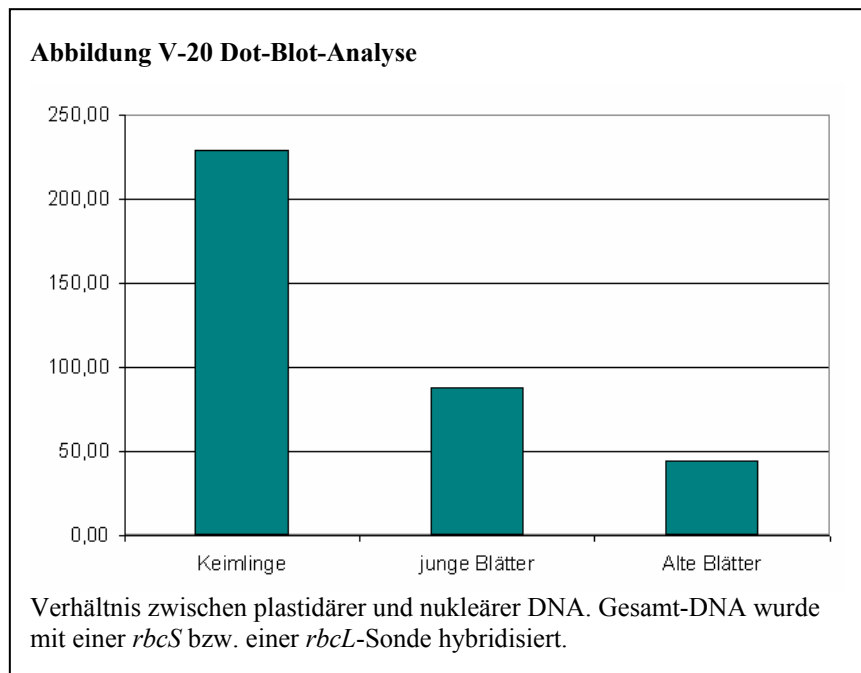
Um das Stadium der Blattentwicklung bestimmen zu können, in dem eine hohe DNA-Replikationsaktivität untersuchbar ist, wurde die ptDNA-Menge mit der DNA-Menge im Kern verglichen. Hierfür wurden Sonden für *rbcS* und *rbcL* verwendet. In mehreren Spezies der Solanaceae gibt es wahrscheinlich fünf Gene der *rbcS*-Familie (Fritz et al., 1993), während es in *Nicotiana tabacum* mindestens vier verschiedene *rbcS*-Gene gibt (Dean et al., 1989). Da *Nicotiana tabacum* allotetraploid ist, gibt es pro Kern also mindestens acht Kopien, wahrscheinlich sogar 20. Das *rbcL*-Gen existiert ein Mal pro Monomer des Plastoms, aber es gibt bis zu 10000 Kopien des Plastoms pro Zelle (Bendich, 1987). Die maximal zu erwartende Rate wäre also 500-fach mehr ptDNA als DNA im Kern. Erste Ergebnisse mit Dot-Blot-Analysen zeigen eine Abnahme des Verhältnisses zwischen plastidärer DNA und nukleärer DNA von Keimblättern zu alten, 120 mm langen Blättern (s. Abb. V-20). Es wurde ein maximales Verhältnis von ptDNA zu Kern-DNA von 229 zu 1 gefunden, also 4580 *rbcL*-Kopien im Plastom, wenn man von 20 *rbcS*-Kopien im Genom ausgeht. Diese Ergebnisse deuten, wie frühere Arbeiten (Boffoy et al., 1979, Lamppa & Bendich, 1979, Lawrence & Possingham, 1986a und 1986b, Baumgartner et al., 1989, Sodmergen et al., 1989, Fujie, 1994, s. III.2, Abb. III-4), darauf hin, dass man die plastidäre DNA-

Abbildung V-19 Kartierung mittels Southern-Analyse



Bsu15I-Verdau von Gesamt-DNA von Wildtyp (WT) und $\Delta oriA/\Delta oriB2$ -Linie (45), Southern-Analyse: hybridisiert mit 23S rRNA-Sonde. λ *HindIII*-Marker. WT-Bande wie erwartet, wenn kein Ende im 8,7 kb-*Bsu15I*-Fragment vorhanden ist. 45 hat eine Bande, wie sie zu erwarten ist, wenn kein Ende vorliegt und eine kleinere Bande, die ein Ende innerhalb des 9,1 kb-*Bsu15I*-Fragments anzeigt.

Replikation in sehr frühen Stadien der Blatentwicklung untersuchen muss. Deshalb wurden für die PFGE-Analyse entsprechend junge Stadien verwendet (s. IV.2.3.2, VI.4).



VI. Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war, das bisherige Modell der plastidären DNA-Replikation zu überprüfen. Dieses beruht auf zirkulären Molekülen der Monomer-Größe als Matrize. Die Replikation beginnt an zwei ca. 7 kb von einander entfernten Replikationsursprüngen (Ori), wobei die Initiation unidirektional in die Richtung des jeweils anderen Ori erfolgt. Genutzt wird der θ -Mechanismus, dessen Produkte zirkuläre Monomere sind. Nachdem die Replikationsgabeln 180° von den Ori entfernt aufeinander treffen, wird ein σ -Mechanismus initiiert, der wiederum zirkuläre Monomere erzeugt (Kolodner & Tewari, 1975, Reviews siehe Heinhorst & Cannon, 1993, Kunnimalaiyaan & Nielsen, 1997a).

Im Plastom von *Nicotiana tabacum* wurden zwei Ori – *oriA* und *oriB* – beschrieben (Lu, et al., 1996, Kunnimalaiyaan et al., 1997, Kunnimalaiyaan & Nielsen, 1997b, Lugo et al., 2004). Von beiden Ori existieren zwei Kopien pro Plastom-Monomer, je ein *oriA/oriB*-Paar befindet sich in jedem *inverted repeat (IR)*. Der *oriA* befindet sich innerhalb des Introns von *trnI* in den *IR*, während die *oriB*-Kopien innerhalb der kodierenden Region von *ycfI* bzw. *orf350* an der Grenze zwischen den *IR* und der *small single copy*-Region (*SSC*) liegen. *In vivo* und *in vitro* können *oriA* und *oriB* sowohl den θ - als auch den σ -Mechanismus initiieren und bestätigen damit das bisherige Modell.

Neuere Arbeiten zeigen dagegen Widersprüche zu dem bisherigen Modell in Bezug auf die Struktur der plastidären DNA (z.B. Lilly et al., 2001, Oldenburg & Bendish, 2004a) und die Replikationsursprünge (z.B. Mühlbauer et al., 2002, Wang et al., 2003).

VI.1. Inaktivierung von *oriA*- und *oriB*-Elementen

Die beiden in *Nicotiana tabacum* beschriebenen Ori sollten mittels Plastiden-Transformation deletiert werden, um die bisherigen Vorstellungen zu überprüfen. Mühlbauer et al., 2002 konnten beide Kopien des *oriA* in allen Kopien der plastidären DNA, d.h. homoplastomisch, entfernen. Diese sind also für die plastidäre DNA-Replikation nicht essentiell, was auch bedeutet, dass eine an *oriA* und *oriB* initiierte θ -Replikation für die Pflanze nicht überlebensnotwendig ist. Im Gegensatz dazu konnten nicht beide Kopien des *oriB* entfernt werden sondern lediglich der *oriB2* innerhalb des nicht-essentiellen *orf350*. Der *oriB1* konnte nur bei einem Teil der Kopien

der plastidären DNA, d.h. heteroplastomisch, deletiert werden. Auch mittels einer Ko-Transformation war es nicht möglich, innerhalb einer Linie beide *oriB*-Kopien zu deletieren. Es wurden entweder homoplastomische $\Delta oriB2$ - oder heteroplastomische $\Delta oriB1$ -Linien erhalten, aber keine Linie, die sowohl homoplastomisch für $\Delta oriB2$, als auch heteroplastomisch für $\Delta oriB1$ -Linien war (Mühlbauer et al., 2002). Da sich der *oriB1* aber innerhalb der kodierenden Region des essentiellen Gens *ycf1* (Drescher et al., 2000, Drescher, 2003) befindet, konnte nicht festgestellt werden, ob der *oriB1* selbst essentiell ist. Auch war unklar, ob beide Ori innerhalb eines IR essentiell sind bzw. ob alle *oriA*- und *oriB*-Kopien inaktiviert werden können oder ob bei einer Deletion eines Teils der Ori die restlichen Kopien ausreichend sind.

VI.1.1. Ko-Transformation mit zwei Vektoren

Mittels einer Ko-Transformation sollten beide *oriA*-Kopien und der *oriB2* deletiert werden (siehe V.1.1.1). Das Ziel, so beide Ori in einem IR auszuschalten, konnte nicht erreicht werden, da die beiden Transformationsereignisse segregierten. Auffallend war, dass der *oriB2* mit deutlich höherer Effizienz als die *oriA* ausgeschaltet wurde. Das steht im Gegensatz zu dem Befund (Mühlbauer et al., 2002), dass beide *oriA* deletiert werden können, während eine Kopie des *oriB* essentiell ist. Deshalb hätte man erwarten können, dass die beiden *oriA*-Kopien leichter entfernbar sind. Nach Lugo et al. (2004) wird *oriA* stärker initiiert als *oriB*, was eine Erklärung für das Ergebnis der Ko-Transformation sein könnte. Auch Oldenburg & Bendich (2004a) haben eine stärkere Initiation bei dem *Oryza sativa*-Homolog des *oriA* aus *Nicotiana tabacum* (bzw. dem Homolog des *oriB* aus *Oenothera elata ssp. hookeri*) gemessen.

VI.1.2. Übertransformation bereits vorhandener Deletionsmutanten

Als Alternativansatz wurde eine Übertransformation einer $\Delta oriA$ -Linie mit einem *oriB2*-Deletionsvektor verwendet (siehe V.1.1.2). Mit diesem war es möglich, drei Ori zu deletieren – d.h. es konnte erstmals in einer Linie homoplastomisch sowohl eine *oriA*- als auch eine *oriB*-Kopie entfernt und Linien hergestellt werden, in denen beide gut charakterisierte Ori innerhalb eines der beiden IR fehlen.

VI.1.3. Inaktivierung von *oriB1*

Wie oben schon beschrieben, befindet sich der *oriB1* innerhalb der kodierenden Region von *ycf1* und kann deshalb nicht deletiert werden (Mühlbauer et al., 2002). Deshalb sollte der *oriB1* durch die Zerstörung der Sekundärstruktur des Replikation-

sursprunges, genauer des *stem loops*, inaktiviert werden. Hierfür sollte die Sequenz unter Erhalt der Aminosäuresequenz mutiert werden. Ein Problem des Ansatzes war, dass der Selektionsmarker 1 kb entfernt von der zu mutierenden Sequenz inseriert werden musste und deshalb die Wahrscheinlichkeit hoch war, dass der Selektionsmarker ohne die mutierte Sequenz inseriert wurde. Tatsächlich konnte nach der Transformation nur in 39% der resistenten Linien die mutierte Sequenz nachgewiesen werden (s. V.1.2). Ein weiteres Problem war, dass in Linien mit intakten *oriB2* die mutierte Sequenz selbst in den Linien wieder verloren ging, in denen sie anfänglich nachgewiesen werden konnte (s. V.1.2). In Linien, in denen der *oriB2* bereits deletiert worden war oder mittels eines Ko-Transformationsansatzes parallel deletiert wurde, konnte der *oriB1* nur in 8,3% bis 11,1% der resistenten Linien mutiert werden (s. V.1.2). Das heißt, der *copy correction*- (Lemieux & Lee, 1987) bzw. *gene conversion*-Mechanismus (Birky & Walsh, 1992, Khakhlova & Bock, 2006) korrigiert durch Rekombination mit der intakten *oriB2*-Kopie eine Mutagenese des *oriB1*. Auch in den Linien, in denen *oriB2* homoplastomisch deletiert worden war, konnte die *oriB2*-Deletion, wenn nicht auf die Insertion der Resistenzkassette selektiert wurde, wegen der Rekombination mit dem intakten *oriB1* wieder kuriert werden (s. V.1.1.3). Dieser Mechanismus konnte durch Deletion der zweiten Kopie des *oriB* überwunden werden.

Mit Hilfe des neuen Ansatzes konnten diese Probleme gelöst werden und in einer Linie sowohl der *oriB1* stark mutiert als auch der *oriB2* deletiert werden. Damit ist es also möglich, nicht nur beide Kopien des *oriA* zu inaktivieren, sondern auch beide Kopien des *oriB*. Keine dieser Kopien, die als notwendig für das bisherige Modell angesehen wurden, ist somit essentiell.

VI.1.4. Können alle *oriA*- und *oriB*-Kopien inaktiviert werden?

Ungeklärt ist die Frage, ob Linien, in denen beide *oriA*- und beide *oriB*-Kopien inaktiviert sind, weiterhin in der Lage sind, die plastidäre DNA zu replizieren. Die Ausschaltung der plastidären DNA-Replikation ist letal, da pflanzliche Zellen ohne plastidäre DNA nicht lebensfähig sind. Selbst in nicht photosynthetisch aktiven Zellkulturen ist das plastidär kodierte *trnE*-Gen für die Tetrapyrrol-Synthese essentiell (Schon et al., 1986, Ellis & Day, 1986, Harada et al., 1992, Cahoon et al., 2003). Das heißt, die plastidäre DNA-Replikation ist für pflanzliche Zellen überlebensnotwendig. In den bisher hergestellten Linien existiert mindestens einer der vier beschriebenen Ori.

Dieser würde für einen σ -Replikationsmechanismus ausreichen, während der θ -Mechanismus auf zwei undirektionale Ori oder einen – bisher nicht identifizierten – bidirektionalen Ori angewiesen ist. In Suspensionskulturen von *Oryza sativa* wurde allerdings ein solcher birektionaler Ori nahe des *rrn23*-Gens beschrieben (Wang et al., 2003). Auch in Suspensionskulturen von *Nicotiana tabacum* wurde in dieser Region ein Ori (Takeda et al., 1992) beschrieben, es wurde aber weder der Mechanismus der Replikation untersucht noch die genaue Sequenz des Ori identifiziert. Wenn zum Beispiel dieser putative Ori die Inaktivierung bzw. Deletion der *oriA*- und *oriB*-Kopien kompensieren kann, dann sollte es möglich sein, alle *oriA*- und *oriB*-Kopien zu inaktivieren.

Ein Versuch in einer $\Delta oriA$ -Linie parallel den *oriB1* zu mutieren und den *oriB2* zu deletieren, war nicht erfolgreich. In keiner transformierten Linie konnte eine mutierte *oriB1*-Sequenz gefunden werden, aber in 61% der Linien wurde der *oriB2* deletiert (siehe V.1.3). Da aber nur 18 resistente Linien erzeugt wurden und bei früheren ähnlichen Ko-Transformationsansätzen für die Erzeugung von drei Linien mit mutierten *oriB1* 27 resistente Linien analysiert werden mussten (s. V.1.2), kann dies auch ein rein statistischer Effekt sein. Es wäre möglich, dass nur mit einem größeren Ansatz Linien erzeugt werden können, in denen alle *oriA*- und *oriB*-Kopien inaktiviert sind. Alternativ könnten markerfreie *oriA*-Linien mittels transienter Selektionsmarker und phänotypischer Selektion (Klaus et al., 2004) hergestellt werden. Diese müssten erst mit einem *oriB2*-Deletionsvektor (pB2, Mühlbauer et al., 2002) und Spectinomycin-Selektion und anschließend einem Vektor für Mutagenese des *oriB1* mit Kanamycin-Selektion (pB1mod nptII, siehe V.1.2) übertransformiert werden. Der Vorteil wäre eine stärkere Selektion.

Auf jeden Fall würden solche Linien ohne *oriA* und *oriB* beweisen, dass weitere Replikationsursprünge und/oder weitere Replikationsmechanismen vorhanden sind.

VI.2. Struktur des Plastoms *in vivo*

Einschlägige Lehrbücher (z.B. Lodish et al., 1995, Buchanan et al., 2000) beschreiben die ptDNA als zirkuläre Monomere. Auch das bestehende Modell plastidärer DNA-Replikation geht von zirkulärer DNA als Matrize und Produkt aus (Kolodner & Tewari, 1975). Oldenburg & Bendich (2004a) fanden dagegen in *Zea mays*, dass ein großer Teil der plastidären DNA als hochmolekulare, linear verzweigte Komplexe vorliegt. Sie geben für *Zea mays* nur 3-4% zirkuläre Moleküle (in Bezug auf die Ge-

samtmasse plastidärer DNA) an. Lilly et al. (2001) fanden in *Nicotiana tabacum* mit Fiber-FISH 42% zirkuläre Moleküle (in Bezug auf die Zahl der Moleküle), 6% *D-loops*, 10% lassoartige, 22% lineare und 17% unklassifizierte Moleküle. Letztere könnten zumindest teilweise den hochmolekularen Komplexen in *Zea mays* entsprechen.

Eigene Pulsfeldgelelektrophoresen (PFGE) zeigen lineare Moleküle der Größe des Monomers, Dimers, Trimers und Tetramers, sowie größere Moleküle, die nicht mehr aufgetrennt werden. Dazu kommt ein „Schmier“ unterhalb der Monomer-Bande, sowie ein großer Anteil, der die Taschen nicht verlässt (siehe V.2.1). Diese Ergebnisse entsprechen den PFGE-Analysen der ptDNA von *Nicotiana tabacum* von Backert et al. (1995), Lilly et al. (2001) und Swiatek et al. (2003).

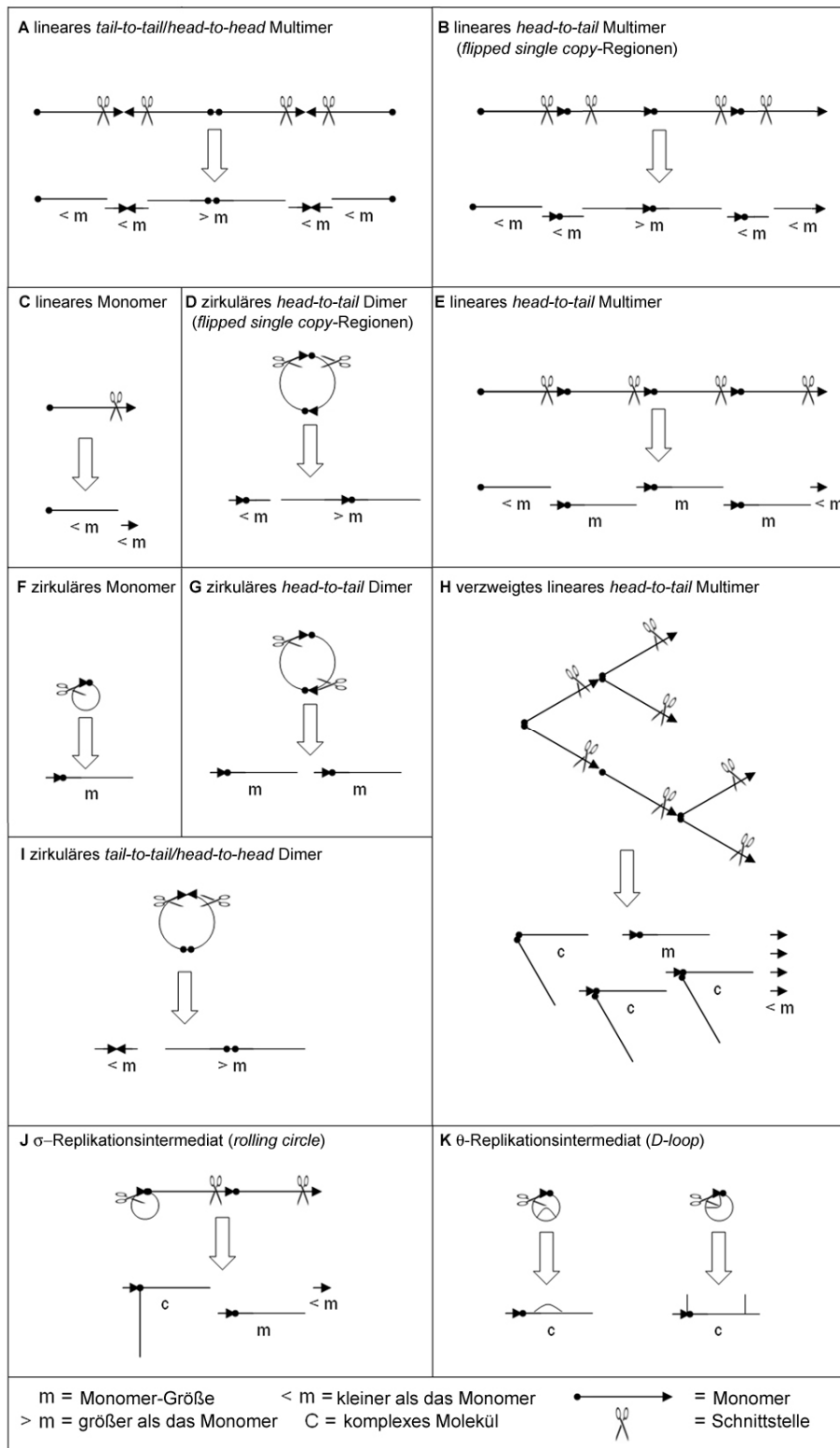
Die ptDNA, die in den Taschen verbleibt, wurde bei *Zea mays* als eine Mischung aus linear verzweigten Komplexen (7% der Moleküle, 93% der DNA-Masse) und zirkulären Molekülen (93% der Moleküle, 7% der DNA-Masse) beschrieben (Oldenburg & Bendich, 2004a). Nach Schneiden der in der Tasche verbleibenden ptDNA mit einem Restriktionsenzym mit einer singulären Schnittstelle pro Monomer und anschließender Auftrennung mit PFGE bestätigen die Befunde bei *Nicotiana tabacum* die Ergebnisse bei *Zea mays*. Es erfolgt eine Anreicherung des Monomers (s. V.2.2, Scharff & Koop, 2006), wie sie nach Restriktion von zirkulären Monomeren und zirkulären *head-to-tail*-verknüpften Multimeren (s. Abb. VI-1 C, E, F, G), aber auch von linear verzweigten Molekülen zu erwarten ist (s. Abb VI-1 H).

VI.2.1. Wie sind die Monomere verknüpft?

Dazu findet man nach Restriktion mit einem Enzym mit einer singulären Schnittstelle pro Monomer, Banden, die in ihrer Größe zwischen Monomer und Dimer lagen (s.V.2.1, Scharff & Koop, 2006). Solche Banden können entweder Fragmente von linearen und zirkulären Multimeren, die nicht *head-to-tail*, sondern *head-to-head/tail-to-tail* verknüpft sind, darstellen (s. Abb VI-1 A, I). Oder es handelt sich um Fragmente von linearen und zirkulären *head-to-tail*-verknüpften Multimeren, deren *single copy*-Regionen in beiden Orientierungen, d.h. „geflippt“, vorliegen (Palmer, 1983, s. Abb. VI-1 B, D). *Head-to-head/tail-to-tail*-Multimere wurden von Kolodner & Tewari (1979) in *Pisum sativum* und von Lilly et al. (2001) in *Nicotiana tabacum* beobachtet, jedoch nicht in *Zea mays* (Oldenburg & Bendich, 2004a). Aber Oldenburg & Bendich

(2004) und Palmer (1983, in *Phaseolus vulgaris*) fanden *head-to-tail*-Multimere mit 'geflippten' *single copy*-Regionen.

Abbildung VI-1 Erklärung für die detektierten Enden



Erklärung für die detektierten Enden. Die Konfigurationen **A**, **B**, **C** and **E** werden durch Prä-Elektrophorese entfernt. Von Konfiguration **I** abgeleitete Fragmente wurden nicht gefunden. Deshalb ist auch **A** unwahrscheinlich. Verzweigte Moleküle (**H**) können auch mit 'geflippten' *single copy*-Regionen vorkommen. Komplexe Strukturen (**c**) laufen wahrscheinlich nicht in das Gel ein.

Die in der vorliegenden Arbeit gefundenen Banden entsprechen ebenfalls der Größe, die man bei *head-to-tail*-verknüpften Multimeren mit „geflippten“ *single copy*-Regionen erwarten würde. Daneben wurden entsprechende Banden, die kleiner als das Monomer waren, gefunden (s. V.2.1.). Die ptDNA von *Nicotiana tabacum* besteht demnach aus *head-to-tail*-Multimeren, deren *single copy*-Regionen in beiden Orientierungen, d.h. „geflippt“ vorliegen (Scharff & Koop, 2006).

VI.2.2. Lineare Moleküle mit definierten Enden

Ein Teil der bereits erwähnten Banden unterhalb der Größe von Monomeren (s. V.2.1, V.2.2, Scharff & Koop, 2006) waren die oben beschriebenen internen Fragmente von *head-to-tail*-verknüpften Multimeren mit „geflippten“ *single copy*-Regionen (s. s. Abb VI-1 B, D). Solche Banden können aber auch die Enden von linearen Molekülen darstellen. Neben linearen Molekülen (s. Abb. VI-1 A, B, C, E) besitzen auch linear verzweigte Komplexe und *rolling circle*-Intermediate (s. Abb. VI-1 H, J) lineare Enden. Alle diese Formen von Molekülen wurden in Plastiden gefunden (Lilly et al, 2001, Oldenburg & Bendich, 2004a, Shaver et al., 2006).

Da definierte Banden gefunden wurden, die kleiner als das Monomer waren aber nicht internen Fragmenten von Molekülen entsprachen, besitzen die linearen oder teilweise linearen Moleküle Enden an bestimmten Positionen. Dies schließt aus, dass die linearen Moleküle durch zufälligen Bruch zirkulärer Moleküle entstanden sind. Eine alternative Erklärung dazu, dass diese definierten Banden von linearen oder teilweise linearen Molekülen herrühren, wären Bruchstellen an bestimmten Stellen der ptDNA-Sequenz. Eine Möglichkeit wäre die Bindestelle der DNA an Membranen. In Proplastiden bindet das PEND-Protein die ptDNA an die innere Hüllmembran (Sato et al., 1993). PEND erkennt eine definierte Sequenz. Die Bindestelle des BnPEND aus *Brassica napus* findet sich 24 Mal im Plastom von *Nicotiana tabacum* (Wycliffe et al., 2005), aber es gibt keine klare Korrelation mit den hier gefundenen Enden. Das DNA-Bindeprotein MFP1 scheint die ptDNA an die Thylakoide in Zellen von Suspensionskulturen und Blättern von *Arabidopsis* zu binden. Aber MFP1 bindet nicht an eine bestimmte Sequenz (Jeong et al., 2003). Daneben bindet Topoisomerase II kovalent an die DNA (Wang, 1996) und manche DNA-Isolationsbedingungen können verursachen, dass die DNA an der Position der Topoisomerase II bricht (Oldenburg & Bendich, 2001). Aber es ist unwahrscheinlich, dass dies definierte Banden zur Fol-

ge hat, da hierfür die Topoisomerase II nicht zufällig auf der ptDNA verteilt sein müsste. Eine andere mögliche Ursache für Fragment-Enden könnten sekundäre Restriktionsschnittstellen des Restriktionsenzymes *SgrAI* sein, die auftreten können, wenn die Enzymkonzentration zu hoch ist (Bitinaite & Schildkraut, 2002). Allerdings gibt es keine Korrelation zwischen den beobachteten Enden und den sekundären Restriktionsschnittstellen von *SgrAI*. Auch an Verzweigungsstellen bei der Rekombination könnten Enden entstehen, z.B. an *hotspots* der Rekombination, und es kann nicht ausgeschlossen werden, dass ein Teil der Enden durch Rekombination verursacht wird. So gibt es in mehreren Arten Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen Replikationsursprüngen und *hotspots* der Rekombination. In *Nicotiana tabacum* könnte sich ein *hotspot* der Rekombination im *trnI*-Intron befinden (Johnson & Hattori, 1996) und dort ist auch der *oriA* lokalisiert (Kunnimalaiyaan & Nielsen, 1997b). In *Chlamydomonas reinhardtii* gibt es einen *hotspot* der Rekombination nahe *psbA* (Newman et al., 1992). Auch hier wurde ein Replikationsursprung nachgewiesen (Woelfle et al., 1993). In T4-Phagen sind ebenfalls Replikationsursprünge *hotspots* der Rekombination (Yap & Kreuzer, 1991).

Aufgrund der vorhandenen Daten entsprechen die beobachteten Banden unterhalb der Größe von Monomeren wirklich Enden von zumindest teilweise linearen Molekülen, die sehr wahrscheinlich Produkte der Replikation sind. Eine Ausnahme sind die Banden, die interne Fragmente von *head-to-tail*-verknüpften Multimeren mit 'geflippten' *single copy*-Regionen darstellen.

VI.2.3. DNA-Struktur und Replikation

Nach dem heutigen Wissensstand besteht die plastidäre DNA also aus einer Mischung aus zirkulären Monomeren und zirkulären *head-to-tail*-verknüpften Multimeren, linearen *head-to-tail*-verknüpften Multimeren und linear verzweigten Komplexen, deren Monomere ebenfalls *head-to-tail* verknüpft sind. Die *single copy*-Regionen kommen in beiden Orientierungen, das heißt „geflippt“, vor (Palmer, 1983). Diese Komplexität der ptDNA-Struktur ist mit dem bisherigen Modell der plastidären DNA-Replikation (Kolodner & Tewari, 1975) nicht vereinbar. Lineare Moleküle mit definierten Enden können über einen σ -Replikationsmechanismus entstehen. Eine Restriktionsanalyse von Replikationsintermediaten würde dann neben, hier nicht detektierten, komplexen Molekülen, die eventuell nicht ins Gel einlaufen, Banden produzieren, die dem Monomer entsprechen bzw. kleiner sind (s. Abb VI-1 J). Da solche Banden be-

obachtet wurden (s. V.2.2), ist ein σ -Replikationsmechanismus möglich. Allerdings stellen sich die Fragen, wie die linear verzweigten Komplexe entstehen, ob hier zirkuläre Moleküle die Matrize für die Replikation darstellen oder nur ein Produkt der Replikation. Ein θ -Replikationsmechanismus kann dagegen nur zirkuläre Moleküle produzieren, und eine Restriktionsanalyse würde nur komplexe Moleküle zur Folge haben (s. Abb. VI-1 K), die wahrscheinlich nicht ins Gel einlaufen können und die hier mittels PFGE nicht beobachtet wurden. Banden, die dem Monomer entsprechen bzw. kleiner sind, wären nicht zu erwarten.

Die beobachteten Enden von linearen oder teilweise linearen Molekülen befänden sich, würde ein σ -Replikationsmechanismus benutzt, auf der Position von Replikationsursprüngen. Bei internen Replikationsursprüngen, wie sie z.B. bei T4-Phagen auftreten (Kreuzer, 2000), wären die Enden Terminationspunkte der Replikation.

VI.2.4. Die Struktur der ptDNA bei $\Delta oriA$ - und $\Delta oriB$ -Linien

Die in früheren Arbeiten hergestellten Linien - $\Delta oriA$, $\Delta oriB1$ (heteroplastomisch) und $\Delta oriB2$ -Linien (Mühlbauer et al., 2002) – und die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Linien – $\Delta oriA/\Delta oriB2$, mutierter $oriB1/\Delta oriB2$ (s. V.1.1.3 und V.1.2) - zeigten bei PFGE-Analysen keine Unterschiede in Bezug auf die DNA-Struktur (s. V.2.1). Die DNA-Struktur wird also nicht dadurch verändert, dass durch Inaktivierung beider $oriA$ -Kopien bzw. beider $oriB$ -Kopien eine an einem $oriA/oriB$ -Paar initiierte θ -Replikation verhindert wird. Das bedeutet, dass die Struktur nicht von diesem Replikationsmechanismus abhängig ist, was angesichts dessen, dass ein θ -Replikationsmechanismus keine linearen Produkte zur Folge haben kann, auch nicht überraschend ist. Auch die vollständige Deletion eines $oriA/oriB$ -Paares in einem *inverted repeat* (und einer $oriA$ -Kopie im anderen *inverted repeat*) verursacht keine Veränderungen der DNA-Struktur. Das kann einerseits bedeuten, dass die Positionierung der Ori in den *inverted repeats* nicht essentiell ist. Dafür spricht, dass es Arten gibt, die entweder überhaupt keine *inverted repeats* im Plastom besitzen (z.B. *Pisum sativum*, Kolodner & Tewari, 1979) oder deren beschriebene Ori nicht innerhalb der *inverted repeats* liegen (*Chlamydomonas reinhardtii*, Waddell et al., 1984, Wang et al., 1984). Andererseits könnten weitere Replikationsursprünge innerhalb der *inverted repeats* den Ausfall der $oriA/oriB$ -Paare kompensieren. Tatsächlich gibt es Hinweise auf weitere Ori innerhalb des *inverted repeat* von *Nicotiana tabacum* (Takeda et al., 2002, Scharff & Koop, 2006, s. V.2.2).

VI.3. Kartierung der Enden linearer und teilweise linearer Moleküle

Mit Hilfe der Fragmente, die kleiner als das Monomer sind und die nicht internen Fragmenten entsprechen, konnte die Position der Enden der linearen bzw. teilweise linearen Moleküle auf der Plastom-Sequenz kartiert werden. In *Zea mays* fanden Oldenburg & Bendich (2004a) Enden linearer Moleküle, die mit den *oriA* und *oriB* von *Oenothera elata ssp. hookeri* bzw. dem *oriA* von *Nicotiana tabacum* homolog waren, sowie weitere Enden, von denen wahrscheinlich eines mit dem bekannten *Zea mays*-Ori in der LSC korreliert (Carrilo & Bogorad, 1988).

Die bei *Nicotiana tabacum* untersuchten Fragmente waren weder Teile des linearen ‚Schmiers‘ noch der linearen Moleküle der Monomer- bzw. einem Vielfachen der Monomer-Größe, die mittels PFGE (s. Abb. V-15, Spur B, C) beobachtet wurden. Diese Moleküle waren vor dem Schneiden mit Restriktionsenzymen mittels einer Prä-Elektrophorese entfernt worden. Die untersuchten Fragmente waren Teil der ptDNA, die in den Taschen verbleibt und in das Gel nur nach dem Schneiden einläuft. Das heißt, diese Fragmente waren Teil von σ -Replikationsintermediaten und linear verzweigten Komplexen (s. Abb. VI-1 H, J), da beim Schneiden von zirkulären Molekülen und θ -Replikationsintermediaten keine Fragmente entstehen, die kleiner als das Monomer sind (s. Abb. VI-1 D, F, G, K). Eine Ausnahme sind die schon erwähnten internen Teile von „geflippten“ *head-to-tail*-verknüpften Multimeren, die deshalb auch bei der Kartierung der Enden nicht berücksichtigt wurden. Unabhängig davon, ob die Fragmente, die kleiner als das Monomer waren, durch Restriktion des linearen ‚Schmiers‘ und der linearen Moleküle oder durch Restriktion der gesamten ptDNA produziert wurden, war bei *Zea mays* kein Unterschied zu beobachten (Oldenburg & Bendich, 2004). Deshalb ist zu erwarten, dass auch bei *Nicotiana tabacum* die geschnittenen linearen Moleküle und die geschnittene ptDNA aus den Taschen in Bezug auf die Enden identisch sind.

VI.3.1. Korrelation der Enden mit bekannten Replikationsursprüngen

In *Nicotiana tabacum* wurden zwei Replikationsursprünge – *oriA* and *oriB* - in den *inverted repeats* mittels 2D-Gelelektrophorese, Elektronenmikroskopie, *primer extension mapping* und *in vitro*-Replikation charakterisiert (Lu et al., 1996, Kunnimalaiyaan et al, 1997, Kunnimalaiyaan & Nielsen, 1997b). Diese Arbeiten ermöglichten die Bestimmung des Minimal-Ori, definiert als die minimale Sequenz, die ausreicht, Replikation *in vitro* zu initiieren und so die exakten Positionen von *oriA* und *oriB* zu kartie-

ren. In Suspensionskulturen beobachteten Takeda et al. (1992) einen zusätzlichen putativen Replikationsursprung durch Kartierung der *D-loops* mittels Elektronenmikroskopie. Allerdings wurde in dieser Arbeit kein Minimal-Ori bestimmt. 21 von 75 (ohne *flipping*) bzw. 42 von 102 (inklusive *flipping*) Enden von Fragmenten wurde in die Region der beiden *oriA* kartiert (s. Abb. V-16, Tab. V-2, Zeile 1, 2). Es gibt demnach eine klare Korrelation zwischen bekannten Replikationsursprüngen und den Enden der hier beschriebenen linearen oder teilweise linearen Moleküle. Die Korrelation der Enden zu den beiden *oriB*-Kopien ist schwächer – besonders wenn nur die Standardabweichung berücksichtigt wird - aber immer noch signifikant (Scharff & Koop, 2006, s. Abb. V-16, Tab. V-2, Zeile 3, 4). Berücksichtigt man nur die Originaldaten und rechnet das *flipping* nicht ein, wurden mehr Enden bei *oriB1* gefunden als bei *oriB2*. Beide Kopien können allerdings deletiert bzw. stark mutiert werden (Mühlbauer et al., 2002, s. IV.1.2). Es ist unklar, ob dieser Unterschied zwischen den beiden *oriB*-Kopien einen funktionellen Hintergrund hat. *oriB1* liegt in der kodierenden Region des essentiellen Gens *ycf1*, dessen Funktion immer noch unbekannt ist (Drescher et al., 2000, Drescher, 2003) während *oriB2* im Leserahmen des nicht essentiellen *orf350* liegt. Das *ycf1*-Gen oder die angrenzenden SSC-Sequenzen könnten Einfluss auf die Aktivität der *oriB* haben.

Der Replikationsursprung in Suspensionskulturen liegt in *Oryza sativa* 3' des 23S rRNA-Gens (Wang et al., 2002) und könnte ein Homolog in *Nicotiana tabacum* (Takeda et al., 1992) besitzen. Da der Minimal-Ori nicht definiert ist, ist die genaue Position dieses Ori unbekannt. Die beiden Kopien dieses Ori wären ungefähr auf den Positionen 105 kb and 134 kb der publizierten Sequenz (Shinozaki et al., 1986, Yukawa et al., 2005, NC_001879) in einem Abstand von je 3.5 kb mittig zwischen *oriA* und *oriB*. Auf diese Positionen wurde eine beträchtliche Zahl von Enden kartiert: 20 von 75 (ohne *flipping*) bzw. 39 von 102 (inklusive *flipping*) (Scharff & Koop, 2006, s. Abb. V-16, Tab. V-2, Zeile 7, 8). Aber es ist nicht auszuschließen, dass diese Enden durch Aktivität von *oriA* oder *oriB* bedingt sind. Der Abstand zwischen diesen Ori ist zu gering, d.h. die Enden können aufgrund der schlechten Auflösung der Kartierung mit PFGE nicht genau genug lokalisiert werden, um die Enden einem dieser Ori eindeutig zuzuordnen.

VI.3.2. Kartierung zusätzlicher Enden

Es wurden 14 Fragmente gefunden (Scharff & Koop, 2006, s. Tab. V-1 und Abb. V-16), die mit keinem der bekannten Replikationsursprünge korrelierten – selbst wenn die größte absolute Abweichung berücksichtigt wurde. Diese Enden fanden sich vor allem nahe den Grenzen zwischen den *inverted repeats* und der *large single copy*-Region. Die Enden könnten auf der Position von zusätzlichen für die plastidäre DNA-Replikation in *Nicotiana tabacum* wichtigen Loci liegen.

In *Zea mays* wurden ebenfalls Enden gefunden, die nicht mit dem bekannten Replikationsursprung in der *large single copy*-Region (Carrillo & Bogograd, 1988) korrelieren. Stattdessen liegen sie auf der Position von Sequenzen, die Homologien zu den *oriA* und *oriB* von *Oenothera elata ssp. hookeri* und den *oriA* von *Nicotiana tabacum* und von *Pisum sativum* aufweisen (Oldenburg & Bendich, 2004a). *oriB* von *Oenothera elata ssp. hookeri* und *oriA* von *Nicotiana tabacum* und *Pisum sativum* wurden zum *trnI*-Gen kartiert. Nielsen et al. (1993) und Chiu & Sears (1992) bestimmten allerdings nicht die exakte Position des *oriA* in *Pisum sativum* bzw. *oriB* in *Oenothera elata ssp. hookeri*. Hornung et al. (1996) nahmen an, dass *oriB* in *Oenothera* innerhalb des *spacer* zwischen *rrn16* und *trnI* läge, präsentierten aber keine Daten, die dort Initiation von Replikation belegen. Der *oriA* von *Nicotiana tabacum* wurde im Intron von *trnI* lokalisiert (Kunnimalaiyaan & Nielsen, 1997b). Deshalb könnten *oriA* von *Nicotiana tabacum* und *P. sativum* sowie *oriB* von *Oenothera elata ssp. hookeri* homologe Sequenzen auf der gleichen Position sein. Sowohl die *oriA* im *trnI*-Intron als auch der *spacer* zwischen *rrn16* und *trnI* konnten in sämtlichen Kopien des *Nicotiana tabacum*-Plastoms entfernt werden, ohne dass Auswirkungen auf die Replikation beobachtet wurden (Mühlbauer et al., 2002). Trotzdem können im Wildtyp Enden in diese Region kartiert werden (Scharff & Koop, 2006, s. Abb. V-16 und Tab. V-2, Zeile 1, 2). In dieser Region könnte also ein Replikationsursprung liegen, der in *Nicotiana tabacum*, *Oenothera elata ssp. hookeri*, *Pisum sativum* und *Zea mays* homolog ist. Diese Region ist stark konserviert, die homologe Sequenz von *Arabidopsis thaliana* ist zu 95% identisch mit der von *Nicotiana tabacum*, die von *Oenothera elata ssp. hookeri* zu 97%, von *Pisum sativum* 93% und von *Zea Mays* 92%. Vergleichsweise konnte in den gleichen Arten nur in *Arabidopsis thaliana* kurze Homologien zu dem *oriB* von Tabak gefunden werden, die aber nicht den ganzen Minimal-Ori umfassten und nur zu 86% identisch waren (eigene *Blast*-Analysen).

Gibt es in *Nicotiana tabacum* auch Enden auf der Position des *oriA* von *Oenothera elata ssp. hookeri* wie in *Zea mays*? *oriA* liegt 1-2 kb 3' von *rrn16* in *Oenothera elata ssp. hookeri* (Chiu & Sears, 1992), was der Position 101 – 102 kb der publizierten Sequenz des *Nicotiana tabacum*-Plastoms (Shinozaki et al., 1986, Yukawa et al., 2005, NC_001879) im *inverted repeat B* bzw. 141 – 142 kb im *inverted repeat A* entspricht. Auf diese Positionen wurden Enden kartiert (Scharff & Koop, 2006, s. Abb. V-16 und Tab. V-2, Zeile 5, 6). Die Anzahl der Enden ist ähnlich wie die Zahl bei den bekannten Replikationsursprüngen von *Nicotiana tabacum*. Deshalb könnte hier ein Ori liegen, der homolog zum *oriA* von *Oenothera elata ssp. hookeri* ist.

Enden wurden auch nahe den Grenzen zwischen den beiden *inverted repeats* und der *large single copy*-Region gefunden. In der Literatur gibt es keinen Hinweis auf einen Replikationsursprung in dieser Region. Aber in *Glycine max* wurden zwei Ori in der *large single copy*-Region nahe eines *inverted repeats* und des *rpl16*-Gens beschrieben (Hedrick et al., 1993). Auch in *Zea mays* (Carrillo & Bogorad, 1988) und *Chlamydomonas reinhardtii* (Lou et al., 1987) wurde ein putativer Replikationsursprung nahe *rpl16* gefunden. Dieses Gen befindet sich auf der Position 83.7 – 85 kb der publizierten Sequenz (Shinozaki et al., 1986, Yukawa et al., 2005, NC_001879) nahe dem *inverted repeat B* im Plastom von *Nicotiana tabacum*. Auf dieser Position wurden Enden gefunden (Scharff & Koop, 2006, s. Abb. V-16, Tab. V-2, Zeile 9). Im Gegensatz dazu gibt es in der Literatur keine Hinweise auf einen Replikationsursprung in der *large single copy*-Region nahe der Grenze zum *inverted repeat A*, obwohl Enden in dieser Region gefunden wurden (Scharff & Koop, 2006, s. Abb. V-16, Tab. V-2, Zeile 10).

VI.3.3. Kartierung der Enden in $\Delta oriA$ -Linien

Wenn die Enden von linearen Molekülen darauf beruhen, dass hier die Replikation initiiert wird, würde man erwarten, dass die Deletion von Replikationsursprüngen den Effekt hat, dass keine Enden mehr auf der Position des Ori zu finden sind.

Die ersten Ergebnisse bei einer $\Delta oriA$ -Linie stehen im Gegensatz zu dieser Erwartung. Es wurden bei allen Experimenten Enden auf der Position der *oriA* gefunden – wie auch auf der Position des putativen Ori der Suspensionskulturen (s.V.2.3, Abb. V-18, Tab. V-4, Zeilen 1, 2, 7, 8). Enden auf den Positionen der *oriB* und der *oriA* von *Oenothera* waren dagegen entweder gar nicht oder selten nachweisbar (s.V.2.3, Abb. V-18, Tab. V-4, Zeilen 3-6). Enden im LSC nahe den *inverted repeats* wurde

dagegen häufiger als beim Wildtyp gefunden (s.V.2.3, Abb. V-18, Tab. V-4, Zeilen 9, 10).

Warum wurden Enden bei *oriA* gefunden, obwohl *oriA* deletiert war? Eine mögliche Erklärung wäre, dass es keinen Zusammenhang zwischen Enden und Replikationsursprüngen gibt. Allerdings kann mittels einer Kartierung mit PFGE nicht zwischen *oriA* und dem putativen Ori der Suspensionskulturen unterschieden werden, da die Standardabweichung größer ist als der Abstand zwischen diesen Ori. Das heißt, die detektierten Enden können durch die Aktivität des Ori, der in Suspensionskulturen beschrieben wurde, verursacht sein. Mittels Southern-Analysen konnte in $\Delta oriA$ -Linien auch ein Ende gefunden werden, das nicht auf die Position des *oriA* kartiert wurde, sondern in der Region des putativen Replikationsursprungs in Suspensionkulturen lokalisiert ist (s. V.2.4). Gleichzeitig wurde mittels PFGE-Analysen in $\Delta oriA$ -Linien eine Abnahme der Zahl der Fragmente beobachtet, deren Enden mit der Position der *oriB* korrelieren. Dies kann bedeuten, dass die *oriB*-Kopien nur gemeinsam mit *oriA* aktiv sind. Der Ausfall von *oriA* und/oder *oriB* müsste dann durch einen alternativen Replikationsmechanismus kompensiert werden, der Enden von linearen oder teilweise linearen Molekülen an der Position des putativen Replikationsursprungs von Suspensionskulturen und im *LSC* nahe den *IR* produziert. Die veränderten Positionen der Enden im Vergleich zum Wildtyp könnten also damit erklärt werden, dass in den $\Delta oriA$ -Linien alternative Replikationsursprünge an diesen Positionen genutzt werden.

VI.3.4. Stellen die Enden Replikationsterminationsstellen dar?

Wie oben schon erwähnt, können die detektierten Enden nicht nur Replikationsursprüngen entsprechen, sondern auch Terminationspunkten der Replikation. In *E. coli* wurden sechs solcher, als *ter* bezeichnete, Sequenzen gefunden (Hidaka et al., 1988, Hill et al., 1988, Hidaka et al., 1991, Pelletier et al., 1989, Sharma & Hill., 1992). Diese Enden wurden mittels Southern-Analyse detektiert, d.h. mit der gleichen Technik, mit der auch ein Ende bei den Ori der Suspensionskulturen gefunden wurde (s. V.2.4). In *E. coli* gibt es einen bidirektionellen θ -Replikationsmechanismus. Die *ter*-Sequenzen liegen 180° vom Ori entfernt, funktionieren aber nur unidirektional. Für die Termination der Replikation nach Fertigstellung eines Monomers wird somit immer ein Paar *ter*-Sequenzen benötigt.

Die in *Nicotiana tabacum* bisher beschriebenen Replikationsursprünge funktionieren unidirektional. Im Falle eines σ -Replikationsmechanismus würden die Terminationssequenzen 360° vom Ori entfernt ebenfalls in den *inverted repeats* liegen. Das heißt die Replikationsursprünge und Terminationssequenzen liegen genau auf der gleichen Position. Hier wurden auch tatsächlich Enden gefunden, weshalb diese Enden sowohl Start- als auch Endpunkte der Replikation darstellen könnten.

Im Gegensatz dazu sollten die Terminationssequenzen im Falle eines θ -Replikationsmechanismus 180° von den Ori entfernt liegen. Das heißt, die Ori wären innerhalb der Moleküle lokalisiert und nicht an den Enden. Hierbei macht es keinen Unterschied, ob die Replikation unidirektional an einem Paar von Ori initiiert wird oder bidirektional an einem Ori. In *Oryza sativa* wurde nicht nur ein unidirektionaler Mechanismus in Blättern gefunden, sondern auch ein bidirektionaler Mechanismus in Suspensionskulturen (Wang et al., 2002 und 2003), während in *Nicotiana tabacum* bisher nur unidirektionale Mechanismen identifiziert wurden (Lu, et al., 1996, Kunnimalaiyaan et al., 1997, Kunnimalaiyaan & Nielsen, 1997b, Lugo et al., 2004). Sowohl die in *Nicotiana tabacum* als auch die in *Oryza sativa* beschriebenen Ori liegen innerhalb der *inverted repeats*, so dass die Terminationssequenzen innerhalb der LSC 180° von den Ori entfernt liegen sollten. Bei der Nutzung der *oriA* und *oriB* müssten die Terminationssequenzen auf den Positionen 26.8, 33.9, 52.8 und 59.8 kb der publizierten Sequenz (Shinozaki et al., 1986, Yukawa et al., 2005, NC_001879) liegen. In diese Regionen konnte allerdings nur ein Ende in einem Experiment detektiert werden, während die Mehrzahl der Enden innerhalb der *inverted repeats* oder nahe den *inverted repeats* lokalisiert wurden (Scharff & Koop, 2006, s. V.2.2, Tab. V-2, Abb. V-16). In der Literatur gibt es nur wenige Hinweise dafür, dass es 180° entfernt von den kartierten Enden einen Replikationsursprung gibt. Takeda et al. (1992) kartierten in Suspensionkulturen von *Nicotiana tabacum* mittels Elektronenmikroskopie bei *psaA* (41,2 – 43,5 kb der publizierten Sequenz, Shinozaki et al., 1986, Yukawa et al., 2005, NC_001879) *D-loops*. Zellkulturen von *Hordeum vulgare*, *Oryza sativa* und *Zea mays* mit großen Deletionen im Plastom konnten dieses noch replizieren, obwohl die Sequenzen mit den bekannten Ori deletiert waren und nur Teile der LSC erhalten waren (Ellis & Day, 1986, Harada et al., 1992, Cahoon et al., 2003).

Im Falle eines σ -Replikationsmechanismus könnten die kartierten Enden also auch Terminationssequenzen entsprechen. Während dies bei Annahme eines θ -Replikationsmechanismus relativ unwahrscheinlich ist.

VI.4. Entwicklungsspezifische Unterschiede?

In der Literatur findet man noch andere Hinweise darauf, dass in *Nicotiana tabacum* weitere Replikationsursprünge existieren. Takeda et al. (1992) fanden in Suspensionskulturen *D-loops* nicht nur nahe dem 23S rRNA-Gen, sondern auch nahe *psaA* in der *large single copy*-Region. Allerdings gibt es sonst keine Hinweise auf einen Ori nahe *psaA*, während in *Oryza sativa* Wang et al. (2002) auch einen Replikationsursprung nahe dem 23S rRNA-Gen beschrieben. Auch Lu et al. (1996) fanden weitere Hinweise: Nach Hybridisierung von angereicherten naszierenden ptDNA-Strängen auf eine *Bam*HI-ptDNA-Bibliothek wurden nicht nur Signale der bekannten Replikationsursprünge *oriA* und *oriB* gefunden sondern auch zusätzliche Fragmente detektiert. Diese Signale waren im Vergleich zu den bekannten Ori schwach und wurden nicht weiter untersucht. Lu et al. (1996) verwendeten junge Blätter von zwei Monate alten Gewächshauspflanzen. Lugo et al. (2004) benutzten für ihre Studien ähnlich alte, 75 mm bis 100 mm lange Blätter von fünf bis sieben Wochen alten *Nicotiana tabacum*-Pflanzen und wiesen ebenfalls die Initiation der Replikation an *oriA* und *oriB* nach. Das bedeutet, Aktivität von *oriA* und *oriB* wurde in relativ alten Blättern gefunden. Im Gegensatz dazu wurde die ptDNA für die PFGE-Analysen dieser Arbeit aus 10-50 mm langen Blättern und Sprossspitzen, die die Blattanlagen enthalten, isoliert (Scharff & Koop, 2006, s. IV.2.3.2).

Gibt es entwicklungsabhängige Unterschiede zwischen diesem verschieden alten Blattmaterial, die die unterschiedlichen Beobachtungen erklären können? Lawrence & Possingham (1986b) wiesen in *Spinacia oleracea* die höchste Replikationsaktivität in den vordersten 5 mm von 20 mm langen Blättern nach, während in älteren Blättern die DNA-Menge pro Plastide durch Teilung der Chloroplasten abnimmt. In *Arabidopsis* wurde die höchste Replikationsaktivität in den Blattanlagen gefunden (Fujie, 1994). Eigene Dot-Blot-Analysen zeigen eine Abnahme der ptDNA-Menge im Vergleich zur Menge der Kern-DNA von Keimblättern zu alten, 120 mm langen Blättern (s. V.2.5.). Die Intensität der ptDNA-Replikation ist also abhängig vom Entwicklungsstadium des Blattes.

Wenn die in frühen Stadien der Blattentwicklung detektierten Enden Replikationsursprüngen entsprechen, gäbe es zusätzliche Replikationsursprünge zu den *oriA* und *oriB*, deren Aktivität in späteren Stadien nachgewiesen wurde. Es könnte also auch in *Nicotiana tabacum* gewebe- und entwicklungsabhängige Nutzung von Repli-

kationsursprüngen geben, wie sie in *Oryza sativa* beobachtet wurden (Wang et al., 2003).

Wang et al. (2003) konnten in *Oryza sativa* zeigen, dass die Nutzung der Replikationsursprünge sich in Blättern, Kotyledonen und Suspensionskulturen unterscheidet. Der Replikationsursprung in Blättern liegt nahe dem Übergang von den *IR* zur *SSC* wie der *oriB* von *Nicotiana tabacum*; entsprechende Sequenzhomologien konnten aber nicht gefunden werden. Der Ori in Suspensionskulturen ist wahrscheinlich homolog zu dem Ori, der auch in Suspensionskulturen von *Nicotiana tabacum* lokalisiert wurde (Takeda et al., 1992). Wang et al. (2003) wiesen bidirektionale Replikation nach und vermuteten, dass dieser Mechanismus der dominierende Replikationsmechanismus sei, während der θ -Mechanismus nur dem Erhalt der plastidären DNA diene.

Dies könnte darauf hindeuten, dass der θ -Mechanismus tatsächlich nicht der dominierende Replikationsmechanismus ist und deshalb die dafür beschriebenen *oriA* und *oriB* nicht essentiell sind. In menschlichen Mitochondrien soll ein unidirektionaler θ -Mechanismus nur für den Erhalt der mtDNA dienen, während ein bidirektionaler Mechanismus für eine schnelle Zunahme der mtDNA verantwortlich sein soll (Holt et al., 2000). Auch in Pflanzen könnte es einen Mechanismus für eine schnelle Replikation der ptDNA in rasch wachsenden Geweben geben, während ein an *oriA* und *oriB* initiiertes θ -Mechanismus für den Erhalt der ptDNA in reifen Blättern dient.

VI.5. Lineare Enden und das bisherige Modell der plastidären DNA-Replikation

Die entwicklungsabhängigen Unterschiede könnten auch erklären, warum die beobachteten Enden linearer oder teilweise linearer Moleküle nicht mit dem bisherigen Modell der DNA-Replikation kompatibel sind. θ -Replikation hat als Produkt keine linearen DNA-Moleküle. Nach diesem Modell (Kolodner & Tewari, 1975) soll 180° von den Ori entfernt, an der Stelle, an der die Replikationsgabeln des θ -Mechanismus aufeinander treffen, die Replikation mit einem σ -Mechanismus fortgesetzt werden. Hierfür müssten sich die Enden innerhalb der *LSC* auf den Positionen 26.8, 33.9, 52.8 und 59.8 kb der publizierten Sequenz (Shinozaki et al., 1986, Yukawa et al., 2005, NC_001879) befinden. Aber in diesen Regionen konnte nur ein Ende in einem Experiment detektiert werden, während die Mehrzahl der Enden in den *IR* oder nahe den *IR* gefunden wurden (s. V.2.2). Eine σ -Replikation, die unmittelbar an eine θ -

Replikation anschließt, ist zumindest in dem untersuchten Stadium der Blattentwicklung unwahrscheinlich.

Im Gegensatz dazu kann ein σ -Replikationsmechanismus, der an den bekannten Replikationsursprüngen oder einem der kartierten putativen Replikationsursprünge initiiert wird, solche Enden produzieren. Aber auch andere, Rekombinationsabhängige Replikationsmechanismen, wie sie Oldenburg & Bendich (2004a, 2004b) vorschlagen, könnten solche Enden produzieren.

Eine zusätzliche Erklärung für die in dieser Arbeit festgestellten Unterschiede zu dem bisherigen Modell könnte sein, dass die Minimal-Ori mit Hilfe von Plasmiden untersucht wurden (Kunnimalaiyaan & Nielsen, 1997b, Lugo et al., 2004). In *E. coli* unterscheiden sich die Anforderungen für die Bindestellen der Ori auf Plasmiden und dem bakteriellen Chromosom (Asai et al., 1998, Weigel et al., 2001). Es könnte deshalb auch Unterschiede bei den Anforderungen für einen Ori für ein plastidäres Chromosom und für ein Plasmid geben.

Das bisherige Modell wäre so nicht falsch sondern es würde lediglich die plastidäre DNA-Replikation in einem Teil der Blattentwicklung beschreiben, während andere Mechanismen für die Replikation in den frühen Stadien verantwortlich sind. Die neuen Erkenntnisse in Bezug auf die Struktur – lineare Multimere und linear verzweigte Komplexe mit definierten Enden, die zumindest teilweise bei beschriebenen Ori lokalisiert sind – und die Hinweise auf die Entbehrlichkeit der bisher charakterisierten Ori bzw. die Hinweise auf zusätzliche Ori könnten die Grundlage für die Entwicklung eines umfassenderen Modells der plastidären DNA-Replikation sein.

VI.6. Wie werden Enden linearer Moleküle erhalten?

Bei linearen Molekülen stellt sich die Frage, wie die 3'-Enden repliziert werden (Watson, 1972). Mehrere Mechanismen wurden vorgeschlagen (Nosek et al., 1998, Kobryn & Chaconas, 2001):

- **Telomerasen:** diese Enzyme, eine spezielle Form von reversen Transkriptasen, dienen im Kern dem Erhalt der Enden der Chromosomen, wurden aber bisher nicht in Plastiden nachgewiesen.
- **Terminales Protein als Primer:** ein Protein, das an den Enden bindet und dort als Primer für die Synthese des Gegenstrangs dient. Dies wurde beim

Bacillus subtilis-Phagen f29 gefunden (Weigl & Seitz, 2006). Ein solches Protein wurde in Plastiden bisher nicht beschrieben.

- **Hairpin loops:** diese befinden sich an den Enden des Moleküls, so dass die Replikation über diese fortgesetzt werden kann, wobei ein Dimer entsteht. *Hairpin loops* wurden im Wildtyp von *Hordeum vulgare* (Collin & Ellis, 1991), sowie in Zellkulturen von *Hordeum vulgare*, *Oryza sativa* und *Zea mays* mit Deletionen im Plastom gefunden (Ellis & Day, 1986, Harada et al., 1992, Cahoon et al., 2003). Dieser Mechanismus kommt also für den Erhalt der Enden in Plastiden in Frage.
- **Tandem repeats:** die Enden werden mittels homologer Rekombination zwischen den *repeats* erhalten. T7-Phagen haben direkte Sequenzwiederholungen an den Enden, wobei jeweils beide Enden eines linearen Moleküls diese aufweisen und somit identisch sind. Das heißt, es liegt eine terminale Redundanz vor. Bei den bei *Nicotiana tabacum* und *Zea mays* untersuchten linearen Molekülen liegt keine terminale Redundanz vor. Aber es existieren lange identische Sequenzen an einem Ende, die bei *Nicotiana tabacum* 32 – 71 kb lang sind, so dass auch hier Rekombination möglich ist (s. Abb. VI-2, Oldenburg & Bendich, 2004a und 2004b). Auch dieser Rekombinations-abhängige Mechanismus kann in Plastiden dem Erhalt der Enden linearer Moleküle dienen.
- **Interne Kopie:** eine interne Kopie wird entweder mittels homologer Rekombination für den Erhalt der Enden genutzt, oder hier transkribierte RNA dient als Primer für die Synthese der Enden. Da die gefundenen Enden überwiegend in den *inverted repeats* liegen, gibt es bei den meisten Arten also auch eine interne Kopie der Enden, so dass auch dieser Mechanismus möglich ist.
- **Replikation als zirkuläres Molekül:** eine Möglichkeit für den Erhalt der Enden von linearen ptDNA-Molekülen ist, dass als Matrize für die Replikation zirkuläre Moleküle dienen. Zirkuläre Moleküle können aus den beschriebenen linearen Molekülen durch homologe Rekombination entstehen.

Da sowohl *hairpin loops* an den Enden als auch zirkuläre Moleküle in Plastiden beschrieben wurden und außerdem bekannt ist, dass es in Plastiden einen homologen Rekombinationsmechanismus (Cerutti et al., 1992 und 1995, Goulding et al., 1996, Kavanagh et al., 1999) gibt, könnten die vier letzten Mechanismen für den Erhalt der

Enden linearer ptDNA-Moleküle verantwortlich sein. Auch eine parallele Aktivität dieser Mechanismen ist möglich.

VI.7. Vergleich zu Mitochondrien

Auch in Bezug auf die Mitochondrien gab es lange die Vorstellung, dass die mtDNA zirkulär vorliegt und mittels eines σ -Mechanismus repliziert wird. In vielen Aspekten ist das Chondriom dem Plastom sehr ähnlich. In beiden Fällen hat bei der Entwicklung eines eubakteriellen Vorläufers zu Organellen ein massiver Gentransfer zum Kern stattgefunden, der immer noch anhält (Leister, 2005), so dass das Chondriom nur noch relativ wenige Gene enthält: Unter anderem sind Untereinheiten der Komplexe der Atmungskette und RNA- und Proteingene, die für die Proteinexpression in den Mitochondrien wichtig sind, kodiert (Burger et al., 2003). Wie bei der plastidären DNA liegt auch die mitochondriale DNA polyploid vor. Und wie bei der ptDNA ging man davon aus, dass die häufige Beobachtung linearer mtDNA auf Isolationsartefakte zurückzuführen ist (Williamson, 2002, Nosek, 2003).

Inzwischen ist klar, dass zirkuläre mtDNA nur in wenigen Gruppen, insbesondere den Metazoa, auftritt. Bei Pilzen, höheren Pflanzen, Algen, Apicomplexa und Ciliaten ist dagegen die mtDNA überwiegend linear, wovon ein Teil zumindest in höheren Pflanzen in der Form linearer, verzweigter Komplexe vorliegt (Bendich, 1993, 1996, Bendich & Smith, 1990, Backert et al., 1995, Backert et al., 1997, Nosek et al., 1998, Oldenburg & Bendich, 2001, Williamson, 2002).

Die zirkuläre mtDNA von humanen Mitochondrien wird vermutlich mittels eines bidirektionalen Mechanismus schnell vermehrt und mittels eines *strand displacement*-Mechanismus erhalten (Holt et al., 2000, Fish et al, 2004), was aber umstritten ist (Bogenhagen & Clayton, 2003a und 2003b, Holt & Jacobs, 2003, Brown et al, 2005). Im Gegensatz dazu wird die mtDNA in höheren Pflanzen wahrscheinlich mittels eines Rekombinations-abhängigen Mechanismus repliziert, der dem Mechanismus der T4-Phagen ähnelt (Backert & Börner, 2000, Oldenburg & Bendich, 2001, Manchekar et al., 2006). Dieser Mechanismus wurde auch für die mtDNA-Replikation in manchen Protisten, Pilzen und Apicomplexa vorgeschlagen (Williamson, 2000). Backert & Börner (2000) entwickelten folgendes Modell: ausgehend von einer Population aus linearen und zirkulären Molekülen, die keine definierte Größe und keine definierten Enden besitzen, wird in frühen Stadien des Wachstums über Rekombination Replikation initiiert, die zu verzweigten komplexen Multimeren führt. In der logarithmischen

Wachstumsphase werden diese mittels durch Rekombination initiierte σ - und θ -Replikation weiter repliziert und die Multimere prozessiert, so dass in der stationären Phase erneut eine Population aus linearen und zirkulären Molekülen, die keine definierte Größe und keine definierten Enden besitzen, vorliegt.

Nicht nur die Replikationsmechanismen zeigen Verwandtschaft mit denen aus Phagen, sondern auch an der Replikation beteiligte Enzyme haben sich vielfach aus Phagen-Proteinen entwickelt (Filee & Fortere, 2005, Shutt & Grey, 2006).

Im Zuge der Entwicklung des Endosymbionten zum Organell wurde anscheinend der Replikationsmechanismus der mtDNA mit Hilfe von Genen, die ursprünglich aus Phagen stammten, an die Erfordernisse der eukaryotischen Zelle angepasst. Die Replikation der mtDNA ähnelt so nicht mehr der von Eubakterien, wie z.B. *E. coli*, sondern der Replikation von T4-Phagen.

Im Vergleich zu Plastiden gibt es Unterschiede: lineare mtDNA hat keine definierten Enden, und es existieren keine Moleküle einer definierten Größe. Lineare ptDNA besitzt definierte Enden, die bei *Nicotiana tabacum* (s. V.2.2 und Scharff & Koop, 2006) und *Zea mays* (Oldenburg & Bendich, 2004a) kartiert wurden. Sie besteht aus Molekülen der Größe des Monomers oder eines Vielfachen der Größe des Monomers (s. V.2.1, Backert et al., 1995, Lilly et al., 2001, Swiatek et al., 2003, Scharff & Koop, 2006). Da sich die Struktur der DNA unterscheidet, muss auch von Unterschieden beim Replikationsmechanismus ausgegangen werden. Im Zuge der Entwicklung der eukaryotischen Zelle haben sich in Mitochondrien und Plastiden unterschiedliche Wege herausgebildet, das Chondriom bzw. das Plastom zu replizieren.

VI.8. Vergleich zu Bakterien und Phagen

Da sich sowohl Mitochondrien als auch Plastiden laut der Endosymbiontentheorie aus Eubakterien entwickelt haben, könnte man erwarten, dass ihre Replikationsmechanismen immer noch eubakteriell bzw. von eubakteriellen Mechanismen abgeleitet sind. Die meisten Eubakterien sollen ein zirkuläres Genom besitzen, was allerdings auch angezweifelt wird (Bendich, 2001). In *E. coli* wird am *oriC* bidirektional ein θ -Replikationsmechanismus initiiert und 180° entfernt an einem Paar der sechs *ter*-Sequenzen terminiert (Lodish et al., 1999, Brown, 2002). Im Gegensatz zu der Erwartung, dass ein Strang kontinuierlich und einer diskontinuierlich synthetisiert wird, gibt es Hinweise, dass beide Stränge diskontinuierlich synthetisiert werden (Amado &

Kuzminov, 2006). Alternativ gibt es auch *oriC*-unabhängige Replikation, die Rekombinations-abhängig ist (RdR, *recombination dependent replication*, Kowalczykowski, 2000).

Es existieren allerdings auch Eubakterien, deren Genom linear ist, z.B. *Borrelia burgdorferi*, dessen Genom aus einem linearen Chromosom, zwölf linearen und neun zirkulären extrachromosomalen Elementen besteht und durch häufige Umordnungen der Sequenz charakterisiert ist (Casjens et al., 2000) Die Replikation wird bei *Borrelia burgdorferi* an bidirektionalen, internen Ori initiiert, während an den Enden *hairpins* vorliegen (Kobryn & Chaconas, 2001, Chaconas, 2005).

Sowohl *E. coli* als auch *Borrelia burgdorferi* unterscheiden sich von Plastiden darin, dass die Replikationsursprünge intern sind, während sie in Plastiden an den Enden bzw. nahe der Enden von linearen Molekülen kartiert wurden (Oldenburg & Bendich, 2004a, Scharff & Koop, 2006, s.V.2.2). Dazu gibt es deutliche strukturelle Unterschiede der DNA, da in Eubakterien bisher keine linearen Multimere und linear verzweigte Komplexe bekannt sind. Die bei *Nicotiana tabacum* beschriebenen *oriA* und *oriB* funktionieren im Gegensatz zu den bakteriellen Ori unidirektional (Lu, et al., 1996, Kunnimalaiyaan et al., 1997, Kunnimalaiyaan & Nielsen, 1997b, Lugo et al., 2004). Lediglich der in *Oryza sativa* beschriebene bidirektionale Replikationsmechanismus (Wang, 2002 und 2003) ähnelt den bakteriellen Ori, die ebenfalls bidirektional sind. Deshalb ist anzunehmen, dass die plastidäre DNA-Replikation nicht mehr der eubakteriellen DNA-Replikation der Vorläufer der Plastiden entspricht.

Das bisherige Modell der plastidären DNA-Replikation beruht auf σ - und θ -Replikation, die unidirektional initiiert wird. σ -Replikation wurde in diversen bakteriellen Plasmiden und in Phagen beschrieben (Novik, 1998, del Solar, 1998, Khan, 2000), wobei, wie bei dem Modell der ptDNA-Replikation, ein zirkuläres Molekül als Matrize für die DNA-Replikation dient. Auch θ -Replikation existiert in Plasmiden, wobei es sowohl bidirektionale Initiation an einem Ori als auch unidirektionale Initiation an zwei Ori vorkommen (del Solar, 1998). Am stärksten ähnelt dem Modell der plastidären DNA-Replikation die Replikation in λ -Phagen. Bei diesen wurde ein kombinierter σ - und θ -Replikationsmechanismus beschrieben. Allerdings wird die θ -Replikation an einem zirkulären Molekül an einem bidirektionalen Ori initiiert, aber nach vollständiger Replikation eines Monomers wird die Replikation mit einem σ -

Mechanismus fortgesetzt (Weigl & Seitz, 2006). Das bisherige Modell der plastidären DNA-Replikation hat also Ähnlichkeiten zu Replikation von Plasmiden und Phagen.

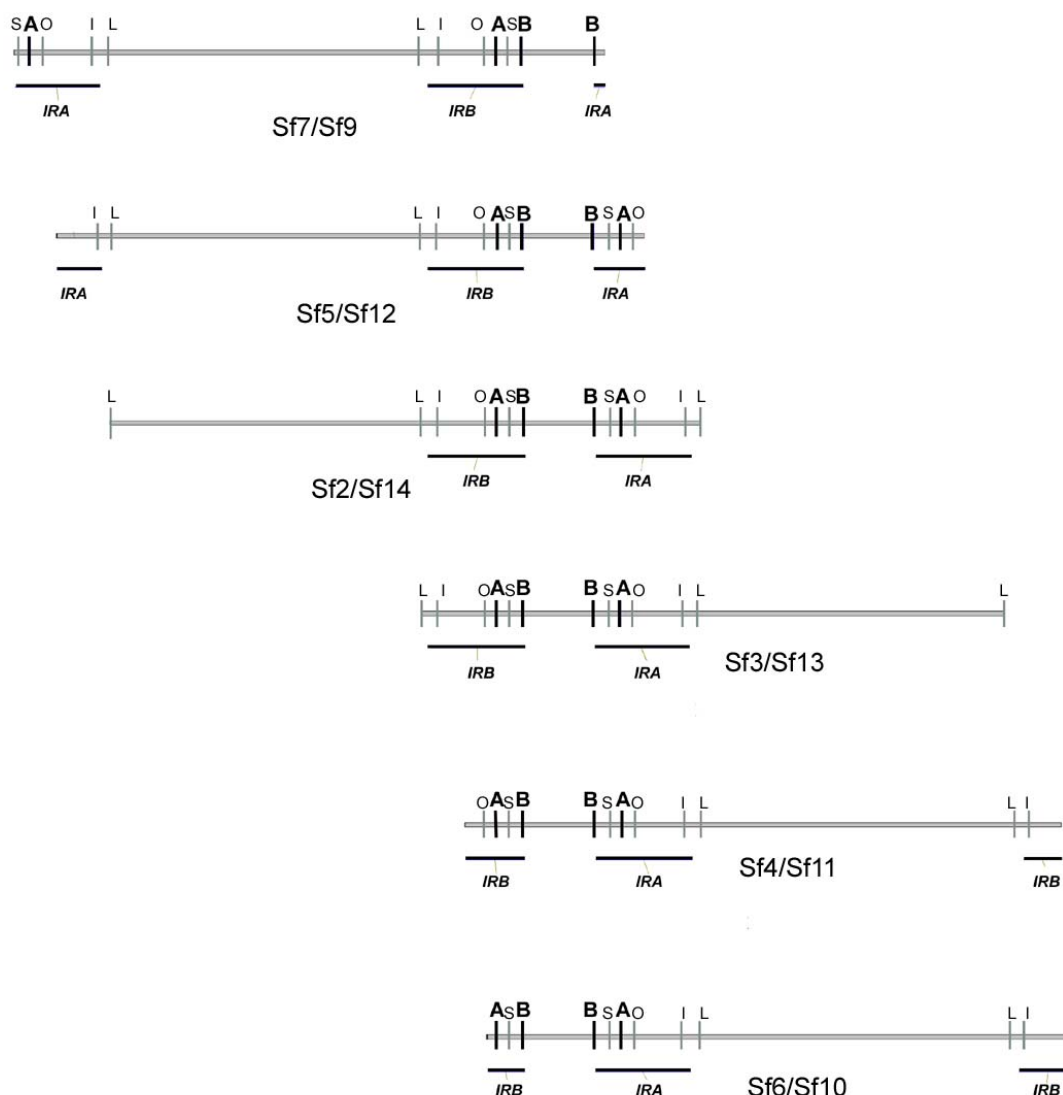
Wie oben schon erwähnt, ähneln Mitochondrien aus höheren Pflanzen den T4-Phagen sowohl in Bezug auf die DNA-Struktur, als auch die DNA-Replikationsmechanismen (Backert & Börner, 2000, Oldenburg & Bendich, 2001, Manchekar et al., 2006). T4-Phagen haben ein lineares dsDNA-Genom, deren Enden wie die der Mitochondrien zirkular permutiert sind. Das bedeutet, die linearen Moleküle besitzen keine Enden an definierten Positionen. Die Enden eines individuellen Moleküls sind allerdings identisch, sie sind terminal redundant. Die Replikation beginnt bei T4-Phagen mit einem bidirektionalen Mechanismus an internen Ori, wobei die Enden unvollständig bleiben. Es folgt eine Konkatemerbildung durch Paarung der überhängenden 3'-Enden. Durch *strand invasion* der 3'-Überhänge in homologe doppelsträngige DNA entstehen komplexe Netzwerke, wobei an den Verzweigungstellen der Rekombination Replikation initiiert wird (*recombination-dependent DNA replication*). Die Netzwerke werden zu linearen Molekülen prozessiert. Die Festlegung der Moleküllänge erfolgt bei den T4-Phagen durch die Größe des Phagenkopfs (Kreuzer, 2000, Weigl & Seitz, 2006). Von Plastiden unterscheiden sich T4-Phagen durch die nicht definierten Enden und die internen Replikationsursprünge.

Die plastidäre DNA-Replikation wurde mit der der T7-Phagen verglichen (Oldenburg & Bendich, 2004b). T7-Phagen haben ein lineares dsDNA-Genom. Wie bei Plastiden entstehen bei der Replikation *head-to-tail*-verknüpfte lineare Multimere und verzweigte Komplexe. Im Gegensatz zu linearen ptDNA-Molekülen sind die DNA-Moleküle der T7-Phagen terminal redundant. Gemeinsam ist dagegen, dass es definierte Enden gibt und ein Ori nahe einem der Enden liegt. Allerdings gibt es im Gegensatz zu den Plastiden nur einen Ori, an dem bidirektionale Replikation startet. Diese produziert unvollständige Enden, da ein 3'-Überhang entsteht. Die Überhänge ermöglichen durch Paarung die Bildung von Multimeren. Über homologe Rekombination zwischen Sequenzwiederholungen ist die Bildung von komplexen Molekülen möglich, wobei mittels *strand invasion* Verzweigungen entstehen. Diese Verzweigungen dienen der Initiation von Rekombinations-abhängiger Replikation (Keppel et al., 1988, Molineux, 1999).

Basierend auf diesen strukturellen Ähnlichkeiten und Unterschieden zwischen der DNA der T7-Phagen und der ptDNA, wurde der *Origin Paired Linear Isomers Re-*

combination-Dependent Replication-Mechanismus (OPaLI-RDR) vorgeschlagen (Oidenburg & Bendich, 2004b). Wenn die plastidäre DNA-Replikation ähnlich wie die der T7-Phagen funktioniert, stellt die fehlende terminale Redundanz der Enden der ptDNA ein Problem dar. Bei T7-Phagen ermöglicht der bidirektionale Replikationsmechanismus die Herstellung von 3'-Überhängen an beiden Enden, die homolog zu den Enden von anderen Molekülen sind, so dass eine Bildung von Dimeren bzw. Multimeren möglich ist.

Abbildung VI-2 Homologe Enden



Darstellung der linearen Fragment-Klassen Sf2/Sf14, Sf5/Sf12, Sf7/Sf9, Sf3/Sf13, Sf4/Sf11 und Sf6/Sf10 (s. Tab. V-2), um die homologen Bereiche zu verdeutlichen. A= *oriA*, B= *oriB*, S = putativer Ori in Suspensionskulturen, O = *oriA* von *Oenothera*, I = Häufung von Enden in den IR, L = Häufung von Enden in der LSC.

Bei der plastidären DNA können homologe 3'-Überhänge nur jeweils an einem Ende erzeugt werden. Zum Beispiel besitzen die Fragmentpaare Sf2/Sf14, Sf5/Sf12 und Sf7/Sf9 3' Enden, die homolog zu den 5' Enden der Fragmentpaare Sf3/Sf13, Sf4/Sf11 und Sf6/Sf10 sind. Diese Paare bilden jeweils ein lineares Molekül der Größe eines Monomers. Die homologe Sequenz ist zwischen 32 kb und 71 kb lang (s. Tab. V-2, Abb. VI-2).

Für den OPaLI-RDR-Mechanismus ist ein Ori-Paar (*Origin Paired*) an diesem homologen Ende notwendig. Um homologe 3'-Überhänge zu produzieren, muss jeweils der innere Ori des Paares aktiv sein, da homologe 3'-Überhänge nur zwischen den beiden Ori gebildet werden können. Wenn nur ein Ori vorhanden wäre, würde bei der Replikation auf dem einen Molekül ein 3'-Überhang entstehen, der stromabwärts des Ori liegt, während auf dem anderen Molekül der 3'-Überhang stromaufwärts gebildet würde. Diese 3'-Überhänge wären nicht homolog, und es wäre auch keine Paarung zwischen den Molekülen möglich. Mit dem Ori-Paar wird so das Problem umgangen, dass keine terminale Redundanz vorliegt.

Ein mittels Paarung gebildetes Dimer besteht allerdings nicht aus zwei kompletten Monomeren. Auch kann das nicht-homologe Ende ohne gepaarten Ori nicht erhalten werden. Diese beiden Probleme sollen nach dem OPaLI-RDR-Modell dadurch gelöst werden, dass über homologe Rekombination und Rekombinations-abhängige Replikation längere Multimere entstehen, die dann komplette Monomere enthalten.

Dieses Modell beruht bisher aber nur auf Untersuchungen der Struktur der ptDNA und der Kartierung ihrer Enden. Bei *Nicotiana tabacum* liegt ein *oriA/oriB*-Paar bei den Wildtyp-Molekülen nahe einem der Enden eines linearen Monomers (und dazu gibt es noch ein internes Paar an dem anderen *inverted repeat*). Allerdings kann für die plastidäre DNA-Replikation in *Nicotiana tabacum* das *oriA/oriB*-Paar nicht essentiell sein, da es zumindest möglich war, beide *oriA*- oder beide *oriB*-Kopien zu inaktivieren (Mühlbauer et al., 2002, s. V.1.2). Die Mutagenese bzw. Deletion dieser Kopien hat auch keine Effekte auf die ptDNA-Struktur (s. V.2.1). Lediglich die Verteilung der Enden linearer oder teilweise linearer Moleküle wird beeinflusst (s. V.2.3). Entweder können alternative Replikationsursprungs-Paare die Rolle des *oriA/oriB*-Paares, übernehmen oder das Modell des OPaLI-RDR-Mechanismus ist zumindest in Hinsicht auf die Notwendigkeit der Ori-Paare nicht zutreffend.

Wie sieht es in Bezug auf die Herkunft der an der Replikation beteiligten Proteine aus? Bisher wurden lediglich eine Gyrase (Cho et al., 2004, Wall et al., 2004) und eine DNA-Polymerase I (Gaikwad et al., 2002, Kimura et al., 2002, Mori et al., 2005) eubakteriellen Ursprungs gefunden. Es bleibt also die Frage, ob die Unterschiede zu eubakteriellen Replikationsmechanismen und die Ähnlichkeiten zu der Replikation von T7-Phagen dadurch bedingt sind, dass ursprünglich aus Phagen stammende Enzyme bei der plastidären DNA-Replikation eine wichtige Rolle spielen. Dies würde beantworten, ob auch bei Plastiden die Integration in die eukaryotische Zelle auf Phagen-Genen beruht.

VI.9. Ausblick

Die bei *Nicotiana tabacum* beschriebenen *oriA* und *oriB* sind wahrscheinlich Teil eines Replikationsmechanismus, der erst in späten Stadien der Blattentwicklung aktiv und nicht essentiell ist. Bisher wurden allerdings nur Linien hergestellt, in der maximal drei dieser vier Ori deletiert waren. Diese beweisen nicht, dass tatsächlich keine Kopie von *oriA* und *oriB* essentiell ist, da ja bisher immer mindestens eine Kopie erhalten blieb. Deshalb wäre es notwendig, mittels neuer Übertransformationen der vorhandenen Linien zu versuchen, alle vier Ori zu inaktivieren (s. VI.1.4). Linien ohne *oriA* und *oriB* wären wahrscheinlich nützlich für die Untersuchung alternativer Replikationsmechanismen bzw. alternativer Nutzung von Replikationsursprüngen, da in diesen Linien auch in späten Stadien der Blattentwicklung alternative Mechanismen aktiv sein dürften.

Die beobachtete Korrelation zwischen Enden linearer ptDNA-Moleküle und der Position von Replikationsursprüngen müsste weiter untersucht werden. Insbesondere wäre zu klären, ob diese Enden überhaupt auf die Aktivität von Replikationsursprüngen zurückgehen und ob tatsächlich weitere Replikationsursprünge identifiziert wurden. Wegen der Messungenauigkeit der PFGE-Analysen ist keine Kartierung dieser zusätzlichen putativen Replikationsursprünge auf eine exakte Position möglich. Es gibt auch keine definierten Minimalreplikationsursprünge für die oben beschriebenen Ori in anderen Arten. Deshalb fehlen exakt definierte Sequenzen, mit deren Hilfe nach Homologien im *Nicotiana tabacum*-Plastom gesucht werden könnte. So ist eine gezielte Inaktivierung dieser Replikationsursprünge durch Mutagenese, Deletion oder Insertion noch nicht möglich. *oriA* und *oriB* von *Nicotiana tabacum* enthalten *stem loops*. Es könnte also nach solchen Strukturen gesucht werden, um diese möglichen

Replikationsursprünge näher zu charakterisieren. Eine weitere Möglichkeit wäre die Kartierung der Enden mittels Southern-Analyse. Diese Kartierung könnte dann noch durch *primer extension mapping* verfeinert werden.

Neben einer verbesserten Kartierung bietet sich die Möglichkeit an, die Aktivität der putativen Ori mittels 2D-Gelelektrophorese (z.B. Kunnimalaiyaan et al., 1997) oder kompetitiver PCR (Singh et al., 2005) direkt nachzuweisen. Die minimal für die Initiation der Replikation notwendige Sequenz kann auch mit Hilfe von *in vitro*-Replikationsansätzen ermittelt werden. Hierbei muss eventuell berücksichtigt werden, dass es entwicklungsabhängige Unterschiede in der Zusammensetzung der notwendigen Proteine geben könnte. Dann müsste die DNA-replizierende Proteinfraction aus Blättern isoliert werden, die im Vergleich zu Lugo et al. (2004) früheren Entwicklungsstadien entsprechen.

Auch die Identifikation der an der Replikation beteiligten Proteine könnte dazu beitragen, die plastidäre DNA-Replikation besser zu verstehen. Neben Homologen zu Genen, die an der eubakteriellen DNA-Replikation beteiligt sind, kann auch nach Homologen von Phagen-Genen in den bisher sequenzierten Genomen (*Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*) gesucht werden.

VI.10. Fazit

Im Widerspruch zu den Erwartungen des bisherigen Modells der plastidären DNA-Replikation, sind bei *Nicotiana tabacum* sowohl *oriA* als auch *oriB* nicht essentiell. Auch wurden im Gegensatz zur Erwartung definierte Enden von linearen bzw. teilweise linearen ptDNA-Molekülen gefunden, deren Positionen teilweise mit den bekannten Replikationsursprüngen korrelieren. Zusätzliche Enden liegen auf Positionen, auf denen in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Glycine max*, *Oenothera elata ssp. hookeri*, *Oryza sativa* und *Zea mays* Replikationsursprünge beschrieben wurden. Weitere Enden haben keine Korrelation mit beschriebenen Replikationsursprüngen. Diese neuen Ergebnisse, zusammen mit neuen Daten über die DNA-Struktur, Replikationsmechanismen und entwicklungsabhängiger Nutzung von Replikationsursprüngen, machen es wahrscheinlich, dass in den verschiedenen Stadien der Blattentwicklung verschiedene DNA-Replikationsmechanismen genutzt werden. Der Mechanismus in den frühen Stadien könnte dem aus T7-Phagen ähneln und sich eventuell sogar aus diesem entwickelt haben. Der Mechanismus in späten Stadien könnte dem alten Modell der DNA-Replikation entsprechen. Im Zuge der evolutionä-

ren Entwicklung des Organells wurde wahrscheinlich die plastidäre DNA-Replikation mittels Mechanismen, die vermutlich aus Phagen stammen, an die Erfordernisse der eukaryotischen Zelle angepasst.

VII. Literatur

- **Aguettaz, P., Seyer, P., Pesey, H., and Lescure, A.M.** (1987) Relations between the plastid gene dosage and the levels of 16S rRNA and *rbcL* gene transcripts during amyloplast to chloroplast change in mixotrophic spinach cell suspensions *Plant Mol Biol* 8(2):169-177.
- **Amado, L. and Kuzminov, A.** (2006) The replication intermediates in *Escherichia coli* are not the product of DNA processing or uracil excision. *J. Biol. Chem*, Epub ahead of print.
- **Asai, T., Bates, D.B., Boye, E., and Kogoma, T.** (1998) Are minichromosomes valid model systems for DNA replication control? Lessons learned from *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 29(3):671-675.
- **Azevedo, J., Courtois, F., and Lerbs-Mache, S** (2006). Sub-plastidial localization of two different phage-type RNA polymerases in spinach chloroplasts. *Nucleic Acids Res.* 34(2):436-444.
- **Backert, S. and Börner, T.** (2000) Phage T4-like intermediates of DNA replication and recombination in the mitochondria of the higher plant *Chenopodium album* (L.). *Curr Genet.* 37(5):304-14.
- **Backert, S. Dörfel, P. and Börner, T.** (1995) Investigation of plant organellar DNAs by pulsed-field gel electrophoresis. *Curr Genet.* 28(4):390-399.
- **Backert, S., Nielsen, B.L. and Börner, T.** (1997) The mystery of the rings: structure and replication of mitochondrial genomes from higher plants. *Trends in Plant Science.* 2(12):477-483.
- **Baumgartner, B.J., Rapp, J.C. and Mullet, J.E.** (1989). Plastid Transcription Activity and DNA Copy Number Increase Early in Barley Chloroplast Development. *Plant Physiol.* 89(3): 1011–1018.
- **Bendich, A. J.** (1987) Why do chloroplasts and mitochondria contain so many copies of their genome? *Bioessays.* 6(6):279-282.
- **Bendich, A. J.** (2001) The form of chromosomal DNA molecules in bacterial cells. *Biochimie.* 83(2):177-86.
- **Bendich, A.J.** (1993) Reaching for the ring: the study of mitochondrial genome structure *Curr Genet* 24(4):279-290.
- **Bendich, A.J.** (1996) Structural Analysis of Mitochondrial DNA Molecules from Fungi and Plants Using Moving Pictures and Pulsed-field Gel Electrophoresis. *J Mol Biol* 255(4):564-588.
- **Bendich, A.J. and Smith, S.B.** (1990) Moving pictures and pulsed-field gel electrophoresis show linear DNA molecules from chloroplasts and mitochondria. *Curr Genet* 17(5):421-425.
- **Birky, C. W. and Walsh, J. B.** (1992) Biased Gene Conversion, Copy Number, and Apparent Mutation Rate Differences Within Chloroplast and Bacterial Genomes. *Genetics.* 130(3):677-683.
- **Birky, C.W.** (1995) Uniparental Inheritance of Mitochondrial and Chloroplast Genes: Mechanisms and Evolution. *PNAS.* 92(25):11331-11338.
- **Birnboim, H.C. and Doly, J.** (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nuc Acids Res.* 7: 1513-1524
- **Bitinaite, J. and Schildkraut, I.** (2002) Self-generated DNA termini relax the specificity of *SgrAI* restriction endonuclease. *PNAS* 99(3):1164-1169.
- **Blowers, A.D., Bogorad, L., Shark, K.B. and Sanford, J.C.** (1989) Studies on *Chlamydomonas* chloroplast transformation: foreign DNA can be stably maintained in the chromosome. *Plant Cell.* 1: 123-132
- **Boffey, S.A, Ellis, J.R, Selldén, G. and Leech, R.M.** (1979) Chloroplast Division and DNA Synthesis in Light-grown Wheat Leaves *Plant Physiol.* 64(3): 502–505.
- **Bogenhagen, D.F. and Clayton, D.A.** (2003a) The mitochondrial DNA replication bubble has not burst. *Trends Biochem. Sci.*28: 357–360.
- **Bogenhagen, D.F. and Clayton, D.A.** (2003b) Concluding remarks: The mitochondrial DNA replication bubble has not burst. *Trends Biochem. Sci.* 28: 404–405.
- **Boynton, J.E., Gillham, N.W., Harris, E.H., Hosler, J.P., Johnson, A.M., Jones, A.R., Randolph-Anderson, B.L., Robertson, D., Klein, T.M. and Shark, K.B.** (1988) Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity microprojectiles. *Science.* 240: 1534-1538.
- **Brown, T.A.** (2002) *Genomes* 2nd ed. New York and London: Garland Science; c2002, Chapter 13
- **Buchanan, B.B., Gruissem, W. and Jones, R.L.** (2000) *Biochemistry & Molecular Biology of Plants.* Rockville: American Society of Plant Physiologist, p. 284

- **Burger, G., Gray, M.W. and Lang, F.B.** (2003) Mitochondrial genomes: anything goes. *Trends in Genetics*. 19(12):709-716.
- **Cahoon, A.B., Cunningham, K.A., Bollenbach, T.J., and Stern, D.B.** (2003) Maize BMS cultured cell lines survive with massive plastid gene loss. *Curr Genet* 44(2):104-113.
- **Carrer, H., Hockenberry, T.N., Svab, Z. and Maliga, P.** (1993). Kanamycin resistance as a selectable marker for plastid transformation in tobacco. *Mol Gen Genet* 241(1-2):49-56.
- **Carrillo, N. and Bogorad, L.** (1988) Chloroplast DNA replication in vitro: site-specific initiation from preferred templates. *Nucleic Acids Res.* 16(12):5603-20.
- **Casjens, S., Palmer, N., van Vugt, R., Huang, W.M., Stevenson, B., Rosa, P., Lathigra, R., Sutton, G., Peterson, J., Dodson, R.J., Haft, D., Hickey, E., Gwinn, M., White, O. and Fraser, C.M.** (2000) A bacterial genome in flux: the twelve linear and nine circular extrachromosomal DNAs in an infectious isolate of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Molecular Microbiology*. 35(3):490-516.
- **Cerutti, H., Johnson, A.M., Boynton, J.E. and Gillham, N.W.** (1995). Inhibition of chloroplast DNA recombination and repair by dominant negative mutants of *Escherichia coli* RecA. *Mol Cell Biol* 15(6):3003-3011.
- **Cerutti, H., Osman, M., Grandoni, P. and Jagendorf, AT.** (1992) A Homolog of *Escherichia coli* RecA Protein in Plastids of Higher Plants. *PNAS*. 89(17):8068-8072.
- **Chaconas, G.** (2005) Hairpin telomeres and genome plasticity in *Borrelia*: all mixed up in the end. *Molecular Microbiology*. 58(3):625-635.
- **Chang, C.-H. and Wu, M.** (2000) The effects of transcription and RNA processing on the initiation of chloroplast DNA replication in *Chlamydomonas reinhardtii* 2000 Mar; 263(2):320-327.
- **Chiu, W. L. and Sears, B. B.** (1992) Electron microscopic localization of replication origins in *Oenothera* chloroplast DNA. *Mol Gen Genet*. 232(1):33-39.
- **Cho, H.S., Lee, S.S., Kim, K.D., Hwang, I., Lim, J.S., Park, Y.I. and Pai, H. S.** (2004) DNA gyrase is involved in chloroplast nucleoid partitioning. *Plant Cell*. 16(10):2665-2682.
- **Church GM & Gilbert W** (1984). Genomic sequencing. *PNAS* 81: 1991-1995.
- **Collin, S. and Ellis, N.T.H.** (1991) Evidence for the presence of hairpin chloroplast DNA molecules in barley cultivars *Curr Genet* 20(3):253-258.
- **Daniell, H., Muthukumar, B. and Lee, S.B.** (2001) Marker free transgenic plants: engineering the chloroplast genome without the use of antibiotic selection. *Curr Genet* 39(2):109-116.
- **Dean, C., Pichersky, E. and Dunsmuir, P.** (1989) Structure, evolution, and regulation of *RbcS* genes in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40:415-439
- **Deng, X.W., Wing, R.A. and Gruissem, W.** (1989) The chloroplast genome exists in multimeric forms. 86, (11): 4156–4160.
- **Dovzhenko, A.** (2001) Towards plastid transformation in rapeseed (*Brassica napus* L.) and sugarbeet (*Beta vulgaris* L.). Dissertation an der LMU München.
- **Dovzhenko, A., Bergen, U. and Koop, H.U.** (1998) Thin-alginate-layer technique for protoplast culture of tobacco leaf protoplasts: shoot formation in less than two weeks. *Protoplasma* 204: 114-118.
- **Draper, C.K. and Hays, J.B.** (2000) Replication of chloroplast, mitochondrial and nuclear DNA during growth of unirradiated and UVB-irradiated *Arabidopsis* leaves. *The Plant Journal*. 23(2):255-265.
- **Drescher A.** (2003) *ycf1*, *ycf14* und RNA-Edierung: Untersuchung an im Lauf der Plastiden-evolution neu hinzu gewonnenen Genen und Eigenschaften. Dissertation. LMU München.
- **Drescher, A., Ruf, S., Calsa, T. Jr, Carrer, H., and Bock, R.** (2000) The two largest chloroplast genome-encoded open reading frames of higher plants are essential genes. *Plant J.* 22(2):97-104.
- **Eberhard, S., Drapier, D., and Wollman, F. A.** (2002) Searching limiting steps in the expression of chloroplast-encoded proteins: relations between gene copy number, transcription, transcript abundance and translation rate in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J.* 31(2):149-160.
- **Eibl, C., Zou, Z., Beck, A., Kim, M., Mullet, J. and Koop, H. U.** (1999) In vivo analysis of plastid *psbA*, *rbcL* and *rpl32* UTR elements by chloroplast transformation: tobacco plastid gene expression is controlled by modulation of transcript levels and translation efficiency. *Plant J.* 19(3):333-345.
- **Ellis, T. H. and Day, A.** (1986) A hairpin plastid genome in barley. *EMBO J.* 5(11):2769-2774.
- **Filee, J. and Forterre, P.** (2005) Viral proteins functioning in organelles: a cryptic origin? *Trends in Microbiology*. 13(11):510-513.

- **Fish, J., Raule, N. and Attardi, G.** (2004) Discovery of a major D-loop replication origin reveals two modes of human mtDNA synthesis. *Science*. 306(5704):2098-2101.
- **Fritz, C.C., Wolter, F.P., Schenkemeyer, V., Herget, T. and Schreier, P.H.** (1993) The gene family encoding the ribulose-(1,5)-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) small subunit of potato. *Gene*. 31, 137(2):271-4.
- **Fujie, M., Kuroiwa, H., Kawano, S., Mutoh, S. and Kuroiwa, T.** (1994) Behavior of organelles and their nucleoids in the shoot apical meristem during leaf development in *Arabidopsis thaliana* L. *Planta* 194(3):395-405.
- **Gaikwad, A., Hop, D.V. and Mukherjee, S.K.** (2002) A 70-kDa chloroplast DNA polymerase from pea (*Pisum sativum*) that shows high processivity and displays moderate fidelity. *Mol Genet Genomics*. 267(1):45-56.
- **Galbraith, D.W., Harkins, K.R., and Knapp, S.** (1991) Systemic Endopolyploidy in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*. 96(3):985-989.
- **Gamborg, O.L., Miller, R.A. and Ojima, K.** (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res* 50, 151 – 158.
- **Gold, B., Carrillo, N., Tewari, K. K. and Bogorad, L.** (1987) Nucleotide sequence of a preferred maize chloroplast genome template for in vitro DNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 84(1):194-198.
- **Golds, T.J., Maliga, P. and Koop, H.U.** (1993) Stable plastid transformation in PEG treated protoplasts of *Nicotiana tabacum*. *Bio/Technology* 11: 95-97.
- **Goulding, S. E., Olmstead, R. G., Morden, C. W. and Wolfe, K. H.** (1996) Ebb and flow of the chloroplast inverted repeat. *Mol Gen Genet*. 252(1-2):195-206.
- **Haas, J.M., Boot, K.J. M., Haring, M.A., Kool, A.J., and Nijkamp, H.J.J.** (1986) A *Petunia hybrida* chloroplast DNA region, close to one of the inverted repeats, shows sequence homology with the *Euglena gracilis* chloroplast DNA region that carries the putative replication origin *Mol Gen Genet* 1986 Jan; 202(1):48-54.
- **Haas, J.M., Kool, A.J., Overbeeke, N., Brug, W. and Nijkamp, H.J.J.** (1987) Characterization of DNA synthesis and chloroplast DNA replication initiation in a *Petunia hybrida* chloroplast lysate system. *Curr Genet* 12(5):377-386.
- **Harada, T., Ishikawa, R., Niizeki, M. and Saito, K.** (1992) Pollen-derived rice calli that have large deletions in plastid DNA do not require protein synthesis in plastids for growth. *Mol Gen Genet*. 233(1-2):145-150.
- **Hedrick, L. A., Heinhorst, S., White, M. A. and Cannon, G. C.** (1993) Analysis of soybean chloroplast DNA replication by two-dimensional gel electrophoresis. *Plant Mol Biol*. 23(4):779-792.
- **Heinhorst, S. and Cannon, G.C.** (1993) DNA replication in chloroplasts. *J Cell Sci*. 104(1):1-9.
- **Heinhorst, S., Cannon, G., and Weissbach, A.** (1985) Chloroplast DNA synthesis during the cell cycle in cultured cells of *Nicotiana tabacum*: inhibition by nalidixic acid and hydroxyurea. *Arch Biochem Biophys*. 239(2):475-479.
- **Herrmann R.G. and Feierabend J.** (1980) The presence of DNA in ribosome-deficient plastids of heat-bleached rye leaves. *Eur J Biochem*. 104(2):603-609
- **Herrmann, R. G., Bohnert, H. J., Kowallik, K. V., and Schmitt, J. M.** (1975) Size, conformation and purity of chloroplast DNA of some higher plants. *Biochim Biophys Acta*. 378(2):305-317.
- **Hidaka, M., Akiyama, M. and Horiuchi, T.** (1988) A consensus sequence of three DNA replication terminus sites on the *E. coli* chromosome is highly homologous to the *terR* sites of the R6K plasmid. *Cell*. 55(3):467-475.
- **Hidaka, M., Kobayashi, T. and Horiuchi, T.** (1991) A newly identified DNA replication terminus site, *TerE*, on the *Escherichia coli* chromosome. *J. Bacteriol*. 173(1):391-393.
- **Hill, T.M., Pelletier, A.J., Tecklenburg, M.L. and Kuempel, P.L.** (1988) Identification of the DNA sequence from the *E. coli* terminus region that halts replication forks. *Cell*. 55(3):459-466.
- **Holt, I.J., Lorimer, H.E. and Jacobs, H.T.** (2000) Coupled leading- and lagging-strand synthesis of mammalian mitochondrial DNA. *Cell*. 100(5):515-524.
- **Holt, I.J. and Jacobs, H.T.** (2003) Response: The mitochondrial DNA replication bubble has not burst. *Trends Biochem. Sci*. 28: 355–356.
- **Hornung, S., Fulgosi, H., Dörfel, P. and 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(5):609-612.

- **Hsieh, C.-H., Wu, M., and Yang, J.** (1991) The sequence-directed bent DNA detected in the replication origin of *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast DNA is important for the replication function *Mol Gen Genet* 225(1):25-32.
- **Huang, F.C., Klaus, S.M.J., Herz, S., Zou, Z., Koop, H.U. and Golds, T.J.** (2002). Efficient plastid transformation in tobacco using the aphA-6 gene and kanamycin selection. *Mol Genet Genomics* 268(1):19-27.
- **Hübschmann, T. and Böjerner, T.** (1998) Characterisation of transcript initiation sites in ribosome-deficient barley plastids *Plant Mol Biol* 36(3):493-496.
- **Jeong, S.Y., Rose, A. and Meier, I.** (2003) MFP1 is a thylakoid-associated, nucleoid-binding protein with a coiled-coil structure. *Nucl. Acids Res.* 31(17):5175-5185.
- **Johnson, D. A. and Hattori, J.** (1996) Analysis of a hotspot for deletion formation within the intron of the chloroplast *trnI* gene. *Genome.* 39(5):999-1005.
- **Kavanagh, T.A., Thanh, N.D., Lao, N.T., McGrath, N., Peter, S.O., Horvath, E.M., Dix, P.J. and Medgyesy, P.** (1999) Homeologous plastid DNA transformation in tobacco is mediated by multiple recombination events. *Genetics* 152(3):1111-1122.
- **Keppel, F., Fayet, O. and Georgopoulos C** (1988). Strategies of Bacteriophage DNA Replication. In Calendar, R. (Ed), *The Bacteriophages*, Vol 1. New York, London: Plenum Press.
- **Khakhlova, O. and Bock, R.** (2006) Elimination of deleterious mutations in plastid genomes by gene conversion. *Plant Journal.* 46(1):85-94.
- **Khan, S.A.** (2000) Plasmid rolling-circle replication: recent developments *Molecular Microbiology.* 37(3):477-484.
- **Kimura, S., Uchiyama, Y., Kasai, N., Namekawa, S., Saotome, A., Ueda, T., Ando, T., Ishibashi, T., Oshige, M., Furukawa, T., Yamamoto, T., Hashimoto, J., and Sakaguchi, K.** (2002) A novel DNA polymerase homologous to *Escherichia coli* DNA polymerase I from a higher plant, rice (*Oryza sativa* L.). *Nucleic Acids Res.* 30(7):1585-1592.
- **Kobayashi, T., Takahara, M., Miyagishima, S. Y., Kuroiwa, H., Sasaki, N., Ohta, N., Matsuzaki, M. and Kuroiwa, T.** (2002) Detection and localization of a chloroplast-encoded HU-like protein that organizes chloroplast nucleoids. *Plant Cell.* 14(7):1579-1589.
- **Kobryn, K. and Chaconas, G.** (2001) The circle is broken: telomere resolution in linear replicons. *Curr Opin Microbiol.* 4(5):558-64.
- **Koller, B. and Delius, H.** (1982) Origin of replication in chloroplast DNA of *Euglena gracilis* located close to the region of variable size. *EMBO J.* 1(8):995-998.
- **Kolodner, R.D. and Tewari, K.K.** (1972) Molecular size and conformation of chloroplast deoxyribonucleic acid from pea leaves. *J Biol Chem.* 247(19):6355-6364.
- **Kolodner, R.D. and Tewari, K.K.** (1975) Chloroplast DNA from higher plants replicates by both the Cairns and the rolling circle mechanism. *Nature.* 256(5520):708-711.
- **Kolodner, R.D. and Tewari, K.K.** (1979) Inverted repeats in chloroplast DNA from higher plants. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 76(1):41-45.
- **Koop H.U. and Schweiger H.G.** (1985): Regeneration of plants from individually cultivated protoplasts using an improved microculture system. *J. Plant Physiol.* 121:245-257.
- **Koop, H.U., Steinmüller, K., Wagner, H., Rossler, C., Eibl, C. and Sacher, L.** (1996) Integration of foreign sequences into the tobacco plastome via polyethylene glycol-mediated protoplast transformation. *Planta* 199: 193-201.
- **Kowalczykowski, S. C.** (2000) Initiation of genetic recombination and recombination-dependent replication. *Trends Biochem Sci.* 25(4):156-65.
- **Kreuzer, K. N.** (2000) Recombination-dependent DNA replication in phage T4. *Trends in Biochemical Sciences.* 25(4):165-173.
- **Kunnimalaiyaan, M. and Nielsen, B.L.** (1997a) Chloroplast DNA replication: mechanism, enzymes and replication origins. *J. Plant Biochem. Biotechnol.* 6, 1-7.
- **Kunnimalaiyaan, M. and Nielsen, B.L.** (1997b) Fine mapping of replication origins (*oriA* and *oriB*) in *Nicotiana tabacum* chloroplast DNA. *Nucleic Acids Res.* 25(18):3681-3686.
- **Kunnimalaiyaan, M., Shi, F. and Nielsen, B.L.** (1997) Analysis of the tobacco chloroplast DNA replication origin (*oriB*) downstream of the 23 S rRNA gene. *J Mol Biol.* 268(2):273-283.
- **Kuroiwa, T., Suzuki, T., Ogawa, K. and Kawano, S.** (1981) The Chloroplast Nucleus: Distribution, Number, Size, and Shape, and a Model for the Multiplication of the Chloroplast Genome during Chloroplast Development. *Plant Cell Physiol.* 22(3):381-396.
- **Lamppa, G.K. and Bendich, A.J.** (1979) Changes in Chloroplast DNA Levels during Development of Pea (*Pisum sativum*). *Plant Physiol.* 64(1): 126-130.

- **Lawrence, M. E. and Possingham, J. V.** (1986a) Direct measurement of femtogram amounts of DNA in cells and chloroplasts by quantitative microspectrofluorometry. *J Histochem Cytochem.* 34(6):761-768.
- **Lawrence, M. E. and Possingham, J. V.** (1986b) Microspectrofluorometric Measurement of Chloroplast DNA in Dividing and Expanding Leaf Cells of *Spinacia oleracea*. *Plant Physiol.* 81(2): 708–710.
- **Leister, D.** (2005) Origin, evolution and genetic effects of nuclear insertions of organelle DNA. *Trends in Genetics.* 21(12):655-663.
- **Lemieux, C. and Lee, R.W.** (1987) Nonreciprocal Recombination between Alleles of the Chloroplast 23S rRNA Gene in Interspecific *Chlamydomonas* Crosses. *PNAS.* 84(12):4166-4170.
- **Li, W., Ruf, S., and Bock, R.** (2006) Constancy of organellar genome copy numbers during leaf development and senescence in higher plants. *Mol Gen Genomic* 275(2):185-192.
- **Lilly, J.W., Havey, M.J., Jackson, S.A. and Jiang, J.** (2001) Cytogenomic analyses reveal the structural plasticity of the chloroplast genome in higher plants. *Plant Cell.* 13(2):245-254.
- **Lodish, H., Baltimore, D., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P. and Darnell, J.** (1995) *Molecular Cell Biology* 3d ed. New York: Scientific American Books. p. 830
- **Lou, J. K., Wu, M., Chang, C. H. and Cuticchia, A. J.** (1987) Localization of a r-protein gene within the chloroplast DNA replication origin of *Chlamydomonas*. *Curr Genet.* 11(6-7):537-541.
- **Lu, Z., Kunnimalaiyaan, M. and Nielsen, B.L.** (1996) Characterization of replication origins flanking the 23S rRNA gene in tobacco chloroplast DNA. *Plant Mol Biol.* 32(4):693-706.
- **Lugo, S.K., Kunnimalaiyaan, M., Singh, N.K. and Nielsen, B.L.** (2004) Required sequence elements for chloroplast DNA replication activity *in vitro* and in electroporated chloroplasts. *Plant Sci.* 166(1):151-161.
- **Maliga, P.** (2004) Plastid Transformation in Higher Plants. *Annu Rev Plant Biol.* 55(1):289-313.
- **Manchekar, M., Scissum-Gunn, K., Song, D., Khazi, F., McLean, S.L. and Nielsen, B.L.** (2006) DNA Recombination Activity in Soybean Mitochondria. *Journal of Molecular Biology.* *J Mol Biol.* 356(2):288-299.
- **Martin, W., Rujan, T., Richly, E., Hansen, A., Cornelsen, S., Lins, T., Leister, D., Stoebe, B., Hasegawa, M. and Penny, D.** (2002) From the Cover: Evolutionary analysis of Arabidopsis, cyanobacterial, and chloroplast genomes reveals plastid phylogeny and thousands of cyanobacterial genes in the nucleus. *PNAS.* 99(19):12246-12251.
- **Medgyesy, P., Fejes, E. and Maliga, P.** (1985) Interspecific Chloroplast Recombination in a *Nicotiana* Somatic Hybrid. *PNAS.* 82(20):6960-6964.
- **Meeker, R., Nielsen, B. and Tewari, K K.** (1988) Localization of replication origins in pea chloroplast DNA. *Mol. Cell. Biol.* 8(3):1216-1223.
- **Meurer, J., Lezhneva, L., Amann, K., Gödel, M., Bezhan, S., Sherameti, I. and Oelmüller, R.** (2002) A Peptide Chain Release Factor 2 Affects the Stability of UGA-Containing Transcripts in Arabidopsis Chloroplasts. *Plant Cell.* 14(12):3255-3269.
- **Molineux, I.** (1999) T7 Bacteriophages. In Creighton, T.C. (1999). *Encyclopedia of Molecular Biology*, Volumes 1-4, New York: John Wiley & Sons.
- **Mori, Y., Kimura, S., Saotome, A., Kasai, N., Sakaguchi, N., Uchiyama, Y., Ishibashi, T., Yamamoto, T., Chiku, H. and Sakaguchi, K.** (2005) Plastid DNA polymerases from higher plants, *Arabidopsis thaliana*. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 334(1):43-50.
- **Mühlbauer, S.K., Lössl, A., Tzekova, L., Zou, Z. and Koop, H.U.** (2002) Functional analysis of plastid DNA replication origins in tobacco by targeted inactivation. *Plant J.* 32(2):175-184.
- **Muller, H.J.** (1964). The relation of recombination to mutational advance. *Mutat Res.* 1: 2-9
- **Murashige, T. and Skoog, F.** (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15, 473 – 497.
- **Murray, M.G. and Thompson, W.F.** (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucl Acids Res.* 8: 4321-4325.
- **Nagata, T and Takebe I.** (1971). Plating of isolated tobacco mesophyll protoplasts on agar medium. *Planta* 99(1)12-20
- **Nie, Z.Q. and Wu, M.** (1999) The Functional Role of a DNA Primase in Chloroplast DNA Replication in *Chlamydomonas Reinhardtii*. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 369(1):174-180.
- **Nielsen, B.L., Lu, Z., and Tewari, K.K.** (1993) Characterization of the Pea Chloroplast DNA *OriA* Region. *Plasmid.* 30(3):197-211.

- **Norrander, J., Kempe, T., and Messing, J.** (1983) Construction of improved M13 vectors using oligodeoxynucleotide-directed mutagenesis. *Gene*. 26(1):101-106.
- **Nosek, J. and Tomaska, L.** (2003) Mitochondrial genome diversity: evolution of the molecular architecture and replication strategy. *Curr Genet* 44(2):73-84.
- **Nosek, J., Tomaska, L., Fukuhara, H., Suyama, Y., and Kovac, L.** (1998) Linear mitochondrial genomes: 30 years down the line. *Trends in Genetics*. 14(5):184-188.
- **Novick, R.P.** (1998). Contrasting lifestyles of rolling-circle phages and plasmids. *Trends Biochem Sci*. 23(11):434-438.
- **Oldenburg, D.J. and Bendich, A.J.** (2001) Mitochondrial DNA from the liverwort *Marchantia polymorpha*: circularly permuted linear molecules, head-to-tail concatemers, and a 5' protein. *J Mol Biol*. 310(3):549-562.
- **Oldenburg, D.J. and Bendich, A.J.** (2004a) Most chloroplast DNA of maize seedlings in linear molecules with defined ends and branched forms. *J Mol Biol*. 335(4):953-970.
- **Oldenburg, D.J. and Bendich, A.J.** (2004b) Changes in the Structure of DNA Molecules and the Amount of DNA Per Plastid During Chloroplast Development in Maize. *Journal of Molecular Biology*. 344(5):1311-1330.
- **O'Neill, C., Horvath, G.V., Horvath, E., Dix, P.J. and Medgyesy, P.** (1993). Chloroplast transformation in plants: polyethylene glycol (PEG) treatment of protoplasts is an alternative to biolistic delivery systems. *Plant J* 3(5):729-738.
- **Palmer, J.D.** (1983) Chloroplast DNA exists in two orientations. *Nature* 301:92-93.
- **Pelletier, A.J., Hill, T.M. and Kuempel, P.L.** (1989) Termination sites T1 and T2 from the *Escherichia coli* chromosome inhibit DNA replication in ColE1-derived plasmids. *J. Bacteriol*. 171(3):1739-1741.
- **Rapp, J.C. and Mullet, J.E.** (1991) Chloroplast transcription is required to express the nuclear genes *rbcS* and *cab*. Plastid DNA copy number is regulated independently *Plant Mol Biol* 17(4):813-823.
- **Ravel-Chapuis, P.; Heizmann, P., and Nigon, V.** (1982) Electron microscopic localization of the replication origin of *Euglena gracilis* chloroplast DNA *Nature*; 300(5887):78-81.
- **Reddy, M. K., Choudhury, N. R., Kumar, D., Mukherjee, S. K. and Tewari, K. K.** (1994) Characterisation and mode of in vitro replication of pea chloroplast OriA sequences. *Eur J Biochem*. 220(3):933-941.
- **Rowan, B. A., Oldenburg, D. J., and Bendich, A. J.** (2004) The demise of chloroplast DNA in *Arabidopsis*. *Curr Genet*. 46(3):176-181.
- **Sakai, A., Suzuki, T., Nagata, N., Sasaki, N., Miyazawa, Y., Saito, Chieko; Inada, N., Nishimura, Y., and Kuroiwa, T.** (1999) Comparative analysis of DNA synthesis activity in plastid-nuclei and mitochondrial-nuclei simultaneously isolated from cultured tobacco cells. *Plant Science*. 140(1):9-19.
- **Sato, N., Albrieux, C., Joyard, J., Douce, R. and Kuroiwa, T.** (1993) Detection and characterization of a plastid envelope DNA-binding protein which may anchor plastid nucleoids. *EMBO J*. 12(2):555-561.
- **Sato, N., Nakayama, M. and Hase, T.** (2001) The 70-kDa major DNA-compacting protein of the chloroplast nucleoid is sulfite reductase. *FEBS Lett*. 487(3):347-350.
- **Sato, N., Terasawa, K., Miyajima, K. and Kabeya, Y.** (2003) Organization, Developmental Dynamics, and Evolution of Plastid Nucleoids. *Int Rev Cytol*. 232:217-262.
- **Scharff, L.B.** (2002) Die Eignung der Glycerin-Kinase für die positive Selektion transgener Pflanzen. Diplomarbeit. LMU München
- **Scharff, L.B. and Koop, H.U.** (2006). Linear molecules of tobacco ptDNA end at known replication origins and additional loci. *Plant Mol Biol*. In Druck.
- **Schon, A., Krupp, G., Gough, S., Berry-Lowe, S., Kannangara, C.G. and Soll, D.** (1986) The RNA required in the first step of chlorophyll biosynthesis is a chloroplast glutamate tRNA. *Nature*. 322(6076):281-284.
- **Seow, F., Sato, S., Janssen, C.S., Riehle, M.O., Mukhopadhyay, A., Phillips, R.S., Wilson, R.J.M.I. and Barrett, M.P.** (2005) The plastidic DNA replication enzyme complex of *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 141(2):145-153.
- **Sharma, B. and Hill, T.M.** (1992) *TerF*, the sixth identified replication arrest site in *Escherichia coli*, is located within the *rscC* gene. *J. Bacteriol*. 174(23):7854-7858.
- **Shaver, J., Oldenburg, D. and Bendich, A.** (2006) Changes in chloroplast DNA during development in tobacco, *Medicago truncatula*, pea, and maize. *Planta* 224(1):72-82
- **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. and Sugiura, M.** (1986) The complete nucleotide sequence of tobacco chloroplast genome: its gene organization and expression EMBO J. 5, 2043-2049
- **Shutt, T. E. and Gray, M. W.** (2006) Bacteriophage origins of mitochondrial replication and transcription proteins. Trends Genet. 22(2):90-95.
 - **Singh, D., Kumar, A., Raghu Ram, E.V.S., and Habib, S.** (2005) Multiple replication origins within the inverted repeat region of the *Plasmodium falciparum* apicoplast genome are differentially activated. Molecular and Biochemical Parasitology. 139(1):99-106.
 - **Sodmergen, K., Shigeyuki, T., Shigemitsu, T., and Kuroiwa, T.** (1989) Preferential digestion of chloroplast nuclei (nucleoids) during senescence of the coleoptile of *Oryza sativa* Protoplasma 152(2 - 3):65-68.
 - **del Solar, G., Giraldo, R., Ruiz-Echevarria, M.J., Espinosa, M., and Diaz-Orejas, R.** (1998) Replication and Control of Circular Bacterial Plasmids. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62(2):434-464.
 - **Sugiura, M., Shinozaki, K., Zaita, N., Kusuda, M. and Kumano, M.** (1986) Clone bank of the tobacco (*Nicotiana tabacum*) chloroplast genome as a set of overlapping restriction endonuclease fragments: mapping of eleven ribosomal proteins. Plant Sci 44:211-216.
 - **Suzuki, T., Kawano, S., Sakai, A., Fujie, M., Kuroiwa, H., Nakamura, H. and Kuroiwa, T.** (1992) Preferential mitochondrial and plastid DNA synthesis before multiple cell divisions in *Nicotiana tabacum*. J Cell Sci. 103(3):831-837.
 - **Svab, Z. and Maliga, P. (1993).** High frequency plastid transformation in tobacco by selection for a chimeric *aadA* gene. PNAS 90(3):913-917.
 - **Svab, Z., Hajdukiewicz, P. and Maliga, P.** (1990). Stable transformation of plastids in higher plants. PNAS 87(21):8526-8530.
 - **Swiatek, M., Greiner, S., Kemp, S., Drescher, A., Koop, H.-U., Herrmann, R.G. and Maier, R.M.** (2003) PCR analysis of pulsed field gel electrophoresis-purified plastid DNA, a sensitive tool to judge the hetero-/homoplastomic status of plastid transformants. Curr. Genet. 43: 45-53
 - **Takeda, Y., Hirokawa, H., Nagata, T.** (1992) The replication origin of proplastid DNA in cultured cells of tobacco. Mol Gen Genet. 232(2):191-198.
 - **Tanaka A., Yamano Y., Fukuzawa H., Ohyama K. and Komano T.** (1984) *In Vitro* DNA Synthesis by Chloroplasts Isolated from *Marchantia polymorpha* L. Cell Suspension Cultures. Agric. Biol. Chem. 48 (5):1239-1244
 - **Thanh, N.D. and Medgyesy, P.** (1989) Limited chloroplast gene transfer via recombination overcomes plastomegenome incompatibility between *Nicotiana tabacum* and *Solanum tuberosum* Plant Mol Biol. 12(1):87-93.
 - **Waddell, J., Wang, X. M. and Wu, M. (1984)** Electron microscopic localization of the chloroplast DNA replicative origins in *Chlamydomonas reinhardtii*. Nucleic Acids Res. 12(9):3843-3856.
 - **Wakasugi, T., Tsudzuki, T., and Sugiura, M.** (2001) The genomics of land plant chloroplasts: Gene content and alteration of genomic information by RNA editing. Photosynth Res. 2001;70(1):107-118.
 - **Walbot V. and Coe E.H.** (1979) Nuclear gene iojap conditions a programmed change to ribosome-less plastids in *Zea mays*. PNAS 76(6):2760-2764.
 - **Wall, M.K., Mitchenall, L.A., and Maxwell, A.** (2004) *Arabidopsis thaliana* DNA gyrase is targeted to chloroplasts and mitochondria. PNAS. 101(20):7821-7826.
 - **Wang, J. C.** (1996) DNA topoisomerases. Annu Rev Biochem. 65:635-692.
 - **Wang, S.L. and Liu, X.Q.** (1991) The plastid genome of *Cryptomonas phi* encodes an hsp70-like protein, a histone-like protein, and an acyl carrier protein. PNAS. 88(23):10783-10787.
 - **Wang, X. M., Chang, C. H., Waddell, J. and Wu, M.** (1984) Cloning and delimiting one chloroplast DNA replicative origin of *Chlamydomonas*. Nucleic Acids Res. 12(9):3857-3872.
 - **Wang, Y., Saitoh, Y., Sato, T., Hidaka, S. and Tsutsumi, K.** (2003) Comparison of plastid DNA replication in different cells and tissues of the rice plant. Plant Mol Biol. 52(4):905-913.
 - **Wang, Y., Tamura, K., Saitoh, Y., Sato, T., Hidaka, S. and Tsutsumi, K.** (2002) Mapping major replication origins on the rice plastid DNA. Plant Biotech. 19: 27-35.
 - **Watson, J.D.** (1972) Origin of concatemeric T7 DNA. Nature: New biology 239(94):197-201.
 - **Weigel, C., Messer, W., Preiss, S., Welzeck, M. and Boye, E.** (2001) The sequence requirements for a functional *Escherichia coli* replication origin are different for the chromosome and a minichromosome. Mol Microbiol. 40(2):498-507

- **Weigel, C. and Seitz, H.** (2006) Bacteriophage replication modules FEMS Microbiology Reviews. 30(3):321-381.
- **Williamson, D.** (2002) The curious history of yeast mitochondrial DNA. Nat Rev Genet. 3(6):475-81.
- **Williamson, D.H., Denny, P.W., Moore, P.W., Sato, S., McCreedy, S. and Wilson, R.J.M.** (2001) The in vivo conformation of the plastid DNA of *Toxoplasma gondii*: implications for replication. Journal of Molecular Biology. 306(2):159-168.
- **Williamson, D.H., Preiser, P.R., Moore, P.W., McCreedy, S., Strath, M. and Wilson, R.J.** (2002) The plastid DNA of the malaria parasite *Plasmodium falciparum* is replicated by two mechanisms. Mol Microbiol. 45(2):533-542
- **Woelfle, M. A., Thompson, R. J., and Mosig, G.** (1993) Roles of novobiocin-sensitive topoisomerases in chloroplast DNA replication in *Chlamydomonas reinhardtii*. Nucleic Acids Res. 21(18):4231-4238.
- **Wolfe, K.H., Li, W.H., and Sharp, P.M.** (1987) Rates of Nucleotide Substitution Vary Greatly among Plant Mitochondrial, Chloroplast, and Nuclear DNAs. PNAS 84(24):9054-9058.
- **Wu, M., Lou, J. K., Chang, D. Y., Chang, C. H. and Nie, Z. Q.** (1986) Structure and Function of a Chloroplast DNA Replication Origin of *Chlamydomonas reinhardtii*. PNAS. 83(18):6761-6765.
- **Wu, M., Nie, Z. Q., and Yang, J.** (1989) The 18-kD Protein That Binds to the Chloroplast DNA Replicative Origin Is an Iron-Sulfur Protein Related to a Subunit of NADH Dehydrogenase. Plant Cell. 1(5):551-557.
- **Wycliffe, P., Sitbon, F., Wernersson, J., Ezcurra, I., Ellerstrom, M. and Rask, L.** (2005) Continuous expression in tobacco leaves of a *Brassica napus* PEND homologue blocks differentiation of plastids and development of palisade cells. Plant J. 44(1):1-15.
- **Yap, WY and Kreuzer, KN.** (1991) Recombination Hotspots in Bacteriophage T4 are Dependent on Replication Origins. PNAS. 88(14):6043-6047.
- **Yukawa, M., Tsudzuki, T. and Sugiura, M.** (2005) The 2005 Version of the Chloroplast DNA Sequence from Tobacco (*Nicotiana tabacum*). Plant Mol Biol Rep 23 (4): 359-365
- **Zerges, W.** (2000) Translation in chloroplasts. Biochimie. 82(6-7):583-601.
- **Zou, Z., Eibl, C. and Koop, H.U.** (2003) The stem-loop region of the tobacco *psbA* 5'UTR is an important determinant of mRNA stability and translation efficiency. Mol Genet Genomics. 269(3):340-349.

VIII. Danksagung

Prof. Dr. Hans-Ulrich Koop danke ich für die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe diese Arbeit durchzuführen, und für seine zahlreichen hilfreichen Anregungen.

Prof. Dr. Dario Leister danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Stefan Kirchner danke ich für seine hervorragende technische Assistenz.

Dr. Uta Geldermann und Stefanie Zintl danke ich für die Durchsicht der Arbeit und ihre Anmerkungen.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die Finanzierung des Projekts (Ko 632/14–1,2).

IX. Lebenslauf

- Name:** Lars Scharff
- Geboren:** 14. Mai. 1976 in München
- Eltern:** Dipl. Rpfl. Paula Scharff und Dipl. Rpfl. Detlef Scharff
- Familienstand:** ledig
- Wohnung:** Himalajastr. 58, 81825 München
- Schule:** 1983-1996 Rudolf-Steiner-Schule München Daglfing.
- Zivildienst:** 1996-1997 Institut für Hydrologie, GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, Neuherberg
- Studium:** Wintersemester 1997/98 – Wintersemester 2002/03, Ludwigs Maximilians-Universität, München (Diplom-Biologie)
- Diplom:** 28.03.2003 (Hauptfach Physiologische Botanik, Nebenfächer: Zellbiologie, Biochemie, Ökologie),
Thema der Diplomarbeit: Die Eignung der Glycerin-Kinase für die positive Selektion transgener Pflanzen
Betreuer: Prof. Dr. Hans-Ulrich Koop
- Promotion:** 15.5.2003 bis September 2006
Betreuer: Prof. Dr. Hans-Ulrich Koop
- Berufliche Tätigkeiten:**
- 2000-03** Studentische Hilfskraft in der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Hans-Ulrich Koop
- 2003-06** Wissenschaftlicher Assistent in der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Hans-Ulrich Koop
- Publikationen:**
- **Scharff, L.B. and Koop, H.U.** (2006). Linear molecules of tobacco ptDNA end at known replication origins and additional loci. Plant Mol Biol (im Druck).
 - **Scharff, L.B. and Koop, H.U.** Simultaneous deletion of three of the four described origins of replication in the tobacco plastid chromosome does not prevent replication (in Vorbereitung).

X. Erklärung

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst, keine anderen, als die angegebenen Hilfsmittel verwendet und sämtliche Stellen, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, mit Quellenangaben kenntlich gemacht habe. Ich versichere, dass ich weder anderweitig ohne Erfolg versucht habe, eine Dissertation einzureichen oder mich der Doktorprüfung zu unterziehen, noch die Dissertation ganz oder in wesentlichen Teilen einer anderen Prüfungskommission vorgelegt habe.

München, den