

***ycf1, ycf14* und RNA-Edierung:
Untersuchungen an im Lauf der Plastidenevolution
neu hinzu gewonnenen Genen und Eigenschaften**



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

vorgelegt von

Anja Drescher

aus Olsberg (NRW)

München 2003

1. Gutachter: **PD Dr. R. M. Maier**

2. Gutachter: **Prof. Dr. H.-U. Koop**

Tag der mündlichen Prüfung: 16. September 2003

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Botanischen Institut der Ludwigs-Maximilians-Universität unter der Leitung von Dr. Rainer M. Maier angefertigt. Ihm danke ich herzlich für seine vorbildliche Betreuung, seine Ideen und die Bereitstellung des interessanten Themas, und auch für die Freiheit, meine eigenen Ideen und Vorstellungen einbringen zu können.

Prof. H.-U. Koop danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferats.

Desweiteren danke ich Prof. R. G. Herrmann für die Bereitstellung meines Laborplatzes und Geräte, seine Diskussionsbereitschaft und die Freiheit, die er mir bei meiner Arbeit gewährte.

Herrn Prof. Ralph Bock danke ich für die Zurverfügungstellung der im Zuge meiner Diplomarbeit entwickelten Mutanten für weitere Untersuchungen.

Den Mitarbeitern des Botanischen Gartens danke ich für ihre Pflanzengaben und ihre freundliche Hilfe bei der Suche nach verschiedenen Monocotarten.

Dr. Uwe Hohmann danke ich für das Beschaffen von Material eines großen Teils der Gräserarten.

Frau Dr. Alice Barkan danke ich für das Zusenden von Maismutantensamen.

Herrn Prof. G. Wanner danke ich für die elektronenmikroskopischen Arbeiten.

Herrn Dr. Bernd Müller und Herrn Dr. Lutz Eichacker danke ich für das Ansequenzieren meines überexprimierten Proteins.

Besonderer Dank gebührt „meiner“ Diplomandin Helena, die mir in meiner „Endphase“ sehr viel Arbeit abgenommen hat, damit ich mich auf's Schreiben konzentrieren konnte.

Den lieben KollegInnen sei für die angenehme Arbeitsatmosphäre gedankt, vor allem den „Kellerasseln“ Christian, Holger, Julia, Michi, Peter und Sabine auch für fruchtbare Diskussionen, wobei Holger besonders für seine Hilfe bei der Computerarbeit gedankt sei.

Magda und Martin danke ich für ihre Freundschaft, die mir das Eingewöhnen in mein neues Leben in München und das neue Labor seinerzeit immens erleichterten, Martin auch für das Korrekturlesen.

Mein Wissen über Proteinbiochemie verdanke ich größtenteils meiner lieben Freundin Claudia, die auch sonst viele Ideen zur Problemlösung parat hatte, auch in Bezug auf das Korrekturlesen der Arbeit.

Auch allen anderen TAs der Arbeitsgruppe danke ich für ihre Hilfsbereitschaft, allen voran Caro und Gabi, die mich zu Beginn in das Labor einführten, und Ingrid für ihre Sequenzierungen und hilfreichen Gespräche und Gisela für ihre freundliche Unterstützung bei der Medienherstellung.

Manfred danke ich für das Gießen meiner Pflanzen, wenn ich es mal nicht ins Institut schaffte.

Uli möchte ich für die Betreuung der Gewächshauspflanzen danken.

Mit großer Freude erinnere ich mich an „meinen“ Diplomanden Tung zurück, der mich seinerzeit nicht nur wißbegierig befragte, sondern dann das Erlernte intelligent in eigene Ideen umwandelte.

Natürlich sind auch alle namentlich hier nicht erwähnten MitarbeiterInnen der Arbeitsgruppe Herrmann nicht vergessen – ihnen danke ich für all die netten, kurzen Gespräche in den Korridoren oder Gemeinschaftslabors.

Gleiches gilt auch für so manche Mitglieder anderer Arbeitsgruppen im Haus, allen voran Andrea, Claudia, Elke (die mich in den DoktorandInnenstammtisch einführte – vielen Dank für die Vermittlung, Didi) und Heidi, die seither auch zu lieben Freundinnen geworden sind. Claudia sei auch für das Korrekturlesen gedankt.

Den Mitarbeitern der Werkstatt danke ich für ihre schnelle, unbürokratische Hilfe bei kleineren technischen Problemen, wie. z.B. der genial-improvisierte Henkel des großen Dewar-Gefäßes.

Allen meinen FreundInnen danke ich für ihren Beistand und ihre Geduld, allen voran meinem Liebsten Horst, der so manchen Abend lange auf mich warten mußte. Ihm gebührt mein besonderer Dank, weil er mich immer verständnisvoll und tatkräftig unterstützte.

Diese Untersuchungen wurden durch den Sonderforschungsbereich 184 der Deutschen Forschungsgemeinschaft finanziert.

INHALT

1	Einleitung	9
1.1	Die Endosymbiontentheorie	9
1.2	Vom Cyanobakterium zur Plastide	10
1.3	Das Plastidengenom	11
1.4	Im Lauf der Evolution hinzu gewonnene Eigenschaften	14
1.4.1	RNA-Edierung	14
1.4.2	Introns	16
1.4.3	Die nukleär kodierte RNA-Polymerase der Plastiden (NEP)	17
1.4.4	Neue Gene?	19
1.5	Aufgabenstellung	20
2	Material und Methoden	21
2.1	Isolierung von Nukleinsäuren	21
2.1.1	Isolierung von Gesamtnukleinsäuren	21
2.1.2	Isolierung von Gesamt-RNA	22
2.1.3	Isolierung von Plasmid-DNA	22
2.1.4	DNA-Isolierung mit dem Qiagen Plasmid Purification Kit	22
2.2	Reinigung von Nukleinsäuren	23
2.2.1	Chloroformextraktion	23
2.2.2	Chloroform/Isoamylalkohol (24:1)-Extraktion	23
2.3	Fällung von Nukleinsäuren	23
2.3.1	Isopropanolfällung	23
2.3.2	Natriumacetatfällung	24
2.3.3	Ammoniumacetatfällung	24
2.4	Enzymatische Modifizierung von Nukleinsäuren	24
2.4.1	DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen	24
2.4.2	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismusanalyse (RFLP)	26
2.4.3	Glätten von DNA-Enden mit dem Klenow-Enzym	26
2.4.4	Dephosphorylierung von DNA-Enden	26
2.5	Ligation von DNA	27
2.6	Transformationstechniken	27
2.6.1	Transformation von Bakterien	27
2.6.2	Biolistische Transformation von Tabak	30
2.7	Reverse Transkription von RNA	34
2.7.1	DNaseI-Verdau	34
2.7.2	Reverse Transkription	35
2.8	Polymerasekettenreaktion (PCR)	35
2.8.1	Durchführung	36
2.8.2	Präparation von Taq-Polymerase	38
2.9	Sequenzierung von DNA	39
2.9.1	Sequenzierung mit dem ABI PRISM 377 System	40
2.9.2	Sequenzierung mit dem LI-COR 4200IR ² System	41
2.10	Gelelektrophorese von Nukleinsäuren	42
2.10.1	Gelelektrophorese von DNA	42
2.10.2	Gelelektrophorese von RNA	43
2.10.3	Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)	44

2.11	DNA-Elution aus Gelen	46
2.11.1	DNA-Elution aus Agarosegelen mit Glaswolle	46
2.11.2	DNA-Elution aus Agarosegelen mit DEAE-Membranen	46
2.11.3	DNA-Elution mit dem QIAEXII Agarose Gel Extraction Kit	47
2.12	Transfer von Nukleinsäuren	47
2.12.1	„Southern Blot“	47
2.12.2	„Northern Blot“	48
2.13	Herstellung radioaktiv markierter Sonden	48
2.13.1	Radioaktive Markierung einer DNA-Sonde	48
2.13.2	Radioaktive Markierung einer RNA-Sonde	49
2.14	Hybridisierung von Nukleinsäuren mit radioaktiv markierten Sonden	49
2.15	Isolierung von Chloroplasten	50
2.16	Isolierung von Proteinen	51
2.17	Gelelektrophorese von Proteinen	53
2.17.1	Analytische SDS-PAGE nach Laemmli	54
2.17.2	Analytische SDS-PAGE nach Schagger und von Jagow	55
2.18	Anfärbung von Proteinen	56
2.18.1	Proteinfärbung mit Coomassie	56
2.18.2	Silberfärbung von Proteinen	57
2.19	Transfer von Proteinen („Western Blot“)	57
2.20	Hybridisierung von Proteinen mit Antisera	58
2.20.1	Immunodetektion mit alkalischer Phosphatase	58
2.20.2	Immunodetektion mit ECL TM (Enhanced Chemoluminescence)	59
2.21	Überexpression von Proteinen in <i>E. coli</i>	60
2.21.1	Transfer zur Überprüfung von Bakterienkolonien („Kolonieblot“)	60
2.21.2	Überexpression im analytischen Maßstab	61
2.21.3	Präparation von „Inclusion Bodies“ (analytischer Maßstab)	61
2.21.4	Präparation von „Inclusion Bodies“ (präparativer Maßstab)	62
2.22	Computerarbeit	64
3	Ergebnisse	65
3.1	Untersuchungen zu <i>ycf1</i>	65
3.1.1	<i>ycf1</i> -Transkription	65
3.1.2	Inaktivierung von <i>ycf1</i>	66
3.1.3	Promotoraustausch von <i>ycf1</i>	70
3.1.4	Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) der <i>ycf1</i> -Mutanten	75
3.1.5	Überexpression von <i>ycf1</i> in <i>E. coli</i> zur Antikörpergewinnung	77
3.2	Untersuchungen zu <i>ycf14</i>	83
3.2.1	Inaktivierung von <i>ycf14</i>	83
3.2.2	Modifizierter Inaktivierungsansatz	89
3.3	Untersuchungen zur RNA-Edierung	94
3.3.1	Phylogenie einer Edierungsstelle im <i>ndhG</i> -„Leader“	94
3.3.2	Untersuchungen an Mais-Mutator-Mutanten	103
4	Diskussion	111
4.1	Diskussion zu <i>ycf1</i>	111
4.1.1	<i>ycf1</i> – Stand der Forschung	111
4.1.2	<i>Ycf1</i> - ein plastidärer Replikationsfaktor?	115
4.1.3	Zum Einsatz des blaulichtinduzierten <i>psbD</i> -Promotor	116

4.2 Diskussion zu <i>ycf14</i>	118
4.2.1 MatK - ein plastidärer Spleißfaktor?	118
Diskussionen zur RNA-Edierung	121
4.2.2 Diskussion der <i>ndhG</i> -Edierungstelle	121
4.2.3 Diskussion der Maismutanten	127
5 Zusammenfassung	129
6 Literatur	131
6.1 Literaturverzeichnis	131
6.2 Publikationsliste	155
7 Lebenslauf	156
8 Abkürzungen	157

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Genkarte des Tabakplastidenchromosoms	13
Abbildung 2: Northernanalyse von Tabak-RNA mit <i>ycf1</i> -spezifischer Sonde.....	66
Abbildung 3: Konstruktion der <i>ycf1</i> „knock-out“-Vektoren	67
Abbildung 4: Morphologie der <i>ycf1</i> -„knock-out“-Mutanten.....	68
Abbildung 5: Elektronenmikroskopische Darstellung der <i>ycf1</i> -„knock-out“-Mutanten.....	68
Abbildung 6: Keimlinge aus Samen der <i>ycf1</i> -„knock-out“-Mutanten (F1).....	69
Abbildung 7: Herstellung des Konstrukts zum Promotoraustausch von <i>ycf1</i>	71
Abbildung 8: Erläuterung der Fragmentgrößen der <i>ycf1</i> PDa-RFLP-Analyse.....	73
Abbildung 9: Southernanalyse der potentiellen <i>ycf1</i> PDa-Transformanden	75
Abbildung 10: Pulsfeldgelelektrophorese der <i>ycf1</i> -Mutanten	76
Abbildung 11: „Kolonieblot“	78
Abbildung 12: Überexpression des 957 Bp-Stücks von <i>ycf1</i>	80
Abbildung 13: Westernanalyse mit dem Ycf1-Antiserum.....	81
Abbildung 14: Westernanalyse gegen Ycf1 verschiedener Pflanzenproben	82
Abbildung 15: Konstruktion des <i>ycf14</i> -„knock-out“-Vektors (matKO).....	84
Abbildung 16: Erläuterung der Fragmentgrößen der matKO-RFLP-Analyse.....	86
Abbildung 17: Southernanalyse der matKO-Transformanden	87
Abbildung 18: Rekombinationsmöglichkeiten nach matKO-Transformation.....	88
Abbildung 19: Konstruktion eines modifizierten Inserts für den <i>ycf14</i> -„knock-out“ (matKOm)	90
Abbildung 20: PCR von matKOm-Transformanden.....	91
Abbildung 21: Erläuterung der Fragmentgrößen der matKOm-RFLP-Analyse.....	92
Abbildung 22: Southernanalyse der matKOm-Transformanden	93
Abbildung 23: Sequenzbeispiel der <i>ndhG</i> -5'-Region.....	96
Abbildung 24: Sequenzvergleich der <i>ndhG</i> -„Leader“ verschiedener Spezies.....	97
Abbildung 25: Stammbaum der untersuchten Arten	99
Abbildung 26: Stammbaumausschnitt der Gräser	100
Abbildung 27: Sequenz des potentiellen Peptids PEP12.....	101
Abbildung 28: Westernanalysen mit dem synthetisierten Peptid PEP12	102
Abbildung 29: Sequenz um die <i>petB</i> -Edierungsstelle	104
Abbildung 30: Morphologie der Maismutatormutanten.....	105
Abbildung 31: Typische Fluoreszenzkurven von Wildtyp- und <i>hcf</i> -Pflanzen.....	106
Abbildung 32: <i>petB</i> -Northernanalyse.....	108
Abbildung 33: Sequenz um die <i>rpl2</i> -Edierungsstelle.....	110
Abbildung 34: Hydropathieprofil von <i>ycf1</i> aus Tabak	112
Abbildung 35: Sequenz des <i>ycf1</i> -Promotors.....	113
Abbildung 36: Sequenz der <i>oriB</i> -Region von Tabak	114
Abbildung 37: Sequenz des verwendeten <i>psbD</i> -Promotors.....	117
Abbildung 38: Mögliche mRNA-Sekundärstrukturen vor dem <i>ndhG</i> -5'-Bereich von Mais.....	124

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Im Laufe der Arbeit verwendete Restriktionsendonukleasen.....	25
Tabelle 2: Liste der verwendeten „Primer“	37
Tabelle 3: Optimale Agarosekonzentration zur Auftrennung von DNA	42
Tabelle 4: Optimale PAA-Konzentrationen zur Auftrennung von Proteinextrakten.....	54
Tabelle 5: Liste der potentiellen Transformanden nach Transformation mit <i>ycf1</i> PDa.....	74
Tabelle 6: Liste der potentiellen Transformanden nach Transformation mit matKO.....	85
Tabelle 7: Liste der potentiellen Transformanden nach wiederholter Transformation mit matKOm.....	91
Tabelle 8: Liste der 27 untersuchten Pflanzenarten.....	95
Tabelle 9: Fluoreszenz und Edierung der Maismutatormutanten	107
Tabelle 10: Edierung bei den Mutanten der zweiten Aussaat.....	109
Tabelle 11: Untersuchte Edierungsstellen der Mutante C34-4 (A).....	110

1 Einleitung

1.1 Die Endosymbiontentheorie

Schon 1883 postulierte Schimper aufgrund von morphologischen Ähnlichkeiten, daß Plastiden von frei lebenden Bakterien abstammen und nicht *de novo* entstehen können. Nachdem solche Beobachtungen auch an Mitochondrien gemacht wurden, formulierten Altmann (1890) und später Mereschowsky (1905) die Endosymbiontenhypothese, nach der die DNA-haltigen Zellorganellen, Plastiden und Mitochondrien, auf in Zellen eingewanderte Bakterien zurückgehen.

Heute zweifelt kaum noch jemand an der inzwischen zur Theorie aufgestiegenen Endosymbiontenhypothese (Gray 1989, Sitte & Eschbach 1992, Herrmann 1997). Schon die Morphologie mit den Doppelmembranen und die Tatsache, daß die Organellen nur aus ihresgleichen hervorgehen und nicht von der Zelle selbst synthetisiert werden können (Sitte & Eschbach 1992), sprach früh für die Richtigkeit der Hypothese. Interesse an und Akzeptanz für die Endosymbiontenhypothese vergrößerten sich durch die Entdeckung der organelleigenen DNA, die wie bei Bakterien doppelsträngig und ringförmig vorliegt (Manning *et al.* 1971, Kolodner & Tewari 1975-a). Auch das Vorkommen von eigenen Transkriptions- und Translationsapparaten mit 70S-Ribosomen ist ein überzeugender Hinweis (Gray 1989). Als sich bei Sequenzvergleichen (Schwartz & Dayhoff 1978, Graf *et al.* 1980, Edwards & Kössel 1981, Koch *et al.* 1981) schließlich zeigte, daß Plastiden von photosynthetischen Cyanobakterien (Giovannoni *et al.* 1988, Delwiche *et al.* 1995) und Mitochondrien von aeroben Purpurbakterien (Yang *et al.* 1985) abstammen, waren letzte Zweifel beseitigt. Man ist sich inzwischen darüber einig, daß Plastiden monophyletischen Ursprungs sind, wobei man es bei manchen Algenlinien mit sekundären oder sogar tertiären Endosymbionten zu tun hat (Herrmann 1997, Palmer 1990, Simpson & Stern 2002). Über die Vorläufer der Wirtszellen wird noch diskutiert, es handelte sich aber wahrscheinlich um Archaeobakterien (Cavalier-Smith & Chao 1996). Eubakterien, die Eocyten aufgenommen haben, aus denen später der Zellkern entstand, wären aber auch eine glaubwürdige Möglichkeit (zusammengefaßt von Lake & Rivera 1994). Auch die Frage, warum es zur Symbiose von Eukaryotenvorläufern mit Bakterien kam, wird noch heiß diskutiert. Zuletzt legten Martin & Müller 1998 mit ihrer Wasserstoffhypothese ein neues und überzeugendes Szenario für die Entstehung der Endosymbiose vor.

1.2 Vom Cyanobakterium zur Plastide

Im Verlauf der Anpassung an das Leben als Endosymbiont haben sich die Cyanobakterien, die die Vorläufer der Plastiden bildeten, massiv verändert. Am auffälligsten ist dabei, abgesehen von der Morphologie, die drastische Reduktion der Genomkapazität: Von durchschnittlich ca. 3.500 Genen bei frei lebenden Cyanobakterien sind nur noch um die 110 (200 – 300 bei manchen Algen) erhalten geblieben (Martin & Herrmann 1998, Martin *et al.* 1998, Simpson & Stern 2002). Dabei ist zu beachten, daß lediglich 10 – 20 % (möglicherweise noch weniger) der in Plastiden benötigten Proteine auch dort hergestellt werden. Ein großer Teil der genetischen Information der Cyanobakterien wurde in das Kerngenom transferiert (mehrere tausend Gene). Ein Vergleich des Genoms von *Synechocystis* mit dem inzwischen komplett sequenzierten Kerngenom von *Arabidopsis* bestätigte dies (Arabidopsis Genome Initiative 2000). Zusätzlich hat man 44 Kerngene plastidären Ursprungs identifizieren können, Gene also, die in Plastiden einiger Spezies noch im Plastom, bei höheren Pflanzen jedoch im Kerngenom zu finden sind (Martin *et al.* 1998).

Nicht nur Proteine werden in die Organellen transportiert: Offenbar werden in Mitochondrien auch kernkodierte tRNAs importiert (Marechal-Drouard *et al.* 1988), und auch bei Plastiden kann angenommen werden, daß dies zumindest bei nichtphotosynthetischen Parasiten mit drastisch reduziertem Plastom (wie z.B. *Epifagus virginiana*, Wolfe *et al.* 1992) der Fall sein könnte. Ebenso ist denkbar, daß die für RNA-Edierung möglicherweise benötigte „guide“-RNA auf diesem Weg in die Plastiden gelangen könnte (Maier *et al.* 1996). Das bewirkt eine Kontrolle der Wirtszelle über die Genexpression in Plastiden, die es ermöglicht, den Plastidentypus an den Bedarf der zellulären Umgebung anzupassen. Man hat es also mit einem integrierten genetischen System zu tun, dessen regulatorische Dominanz der Zellkern inne hat. Es wäre daher falsch, von semiautonomen Organellen zu sprechen (Herrmann 1997). Nicht alle cyanobakteriellen Gene wurden im Lauf der Evolution jedoch behalten. Einige Eigenschaften, die für das Leben freilebender Zellen nötig sind, sind für den Endosymbionten nutzlos geworden, so z.B. die Komponenten einer Zellwand oder eines Bewegungsapparates. Andere, wie z.B. Gene für Enzyme für Grundstoffwechselwege, waren redundant und konnten z.B. durch die mitochondrialen Homologe ersetzt werden (Martin & Schnarrenberger 1997). Ebenso wurden Enzyme eubakterieller Herkunft für den Stoffwechsel der Wirtszelle genutzt.

Abgesehen von den hier beschriebenen Eigenschaften, die im Laufe der Plastidenevolution verloren wurden, gibt es Beispiele, die - gegen diesen Trend - bei Cyanobakterien bisher nicht gefunden wurden und daher wahrscheinlich im Lauf der Evolution neu hinzu gekommen sind (siehe Kapitel 1.4). Dabei ist zu beachten, daß Plastiden je nach Gewebe in unterschiedlichen Differenzierungen vorliegen und dort jeweils unterschiedliche Funktionen zu erfüllen haben (Thomson & Whatley 1980). Das Ausdifferenzieren des jeweiligen Plastidentyps bedarf der an die pflanzliche Zellentwicklung angepaßten Steuerung, wobei die Plastidendifferenzierung potentiell reversibel ist (Gruissem & Tonkyn 1993).

1.3 Das Plastidengenom

Wie in den prokaryotischen Vorfahren der Plastiden sind viele ihrer Transkripte poly-zistronisch, werden aber im Gegensatz zu den Prokaryoten posttranskriptionell in mono- und oligozistronische Untereinheiten prozessiert (Barkan 1988, Barkan 1989), wofür man inzwischen eine Reihe kernkodierter Faktoren kennt (Barkan & Goldschmidt-Clermont 2000). Wie bei Prokaryoten ist das Plastidengenom zirkulär. Es wird unabhängig von der Replikation des Kerngenoms repliziert (Heinhorst *et al.* 1985). Die Verdopplung plastidärer Chromosomen erfolgt wahrscheinlich nach zwei verschiedenen Mechanismen: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von replizierenden Plastidenchromosomen bei Mais und Erbse zeigen den Beginn der Replikation an zwei auf verschiedenen DNA-Strängen, ca. 7 kB voneinander entfernt liegenden Initiationspunkten (*oriA/B*) unter Ausbildung sogenannter „displacement-loops“ (D-loops). Nach Ankunft am jeweils gegenüberliegenden Initiationspunkt beginnt die Synthese des komplementären Stranges, und die Replikationsgabeln wandern bidirektional (entsprechend dem „Cairns-Typ“) auseinander, bis sie aufeinander treffen (Kolodner & Tewari 1975-b). Bei Plastiden wurde auch der „rolling circle“-Mechanismus beschrieben (Kolodner & Tewari 1975-b), wobei das Vorhandensein von mehr als einem Replikationsstart (*ori*) und im Fall von zwei *ori*-Kopien der Abstand zwischen ihnen darüber entscheidet, welcher Mechanismus bevorzugt angewandt wird. Da sich die Beobachtungen der EM-Bilder mit *in vitro*-Experimenten diesbezüglich decken, wird davon ausgegangen, daß dies der Situation *in vivo* entspricht (Kunnimalaiyaan & Nielsen 1997).

Desweiteren liegt das Plastom hoch polyploid vor. Je nach Plastidentyp können 5 - 10 (Proplastiden) oder bis zu 100 Kopien (Chloroplasten) des Chromosoms in einem Organell vorliegen. Eine Zelle kann bis zu 100 Plastiden enthalten (Blattzelle). So kommt es, daß die

Plastiden-DNA ca. 10 – 20 % des gesamten DNA-Gehalts der Zelle ausmacht, obwohl das Plastom im Vergleich zum Kerngenom nur eine verschwindend geringe Anzahl Gene beherbergt (Bendich 1987). Kopien plastidärer Chromosomen sind in DNA-Protein-Komplexen, sogenannten Nukleoiden, organisiert (Nemoto *et al.* 1990). Die Größe eines Plastidenchromosoms beträgt meist 120 bis 160 kB, wobei es bei nichtphotosynthetischen Parasiten zu starken Reduktionen kommen kann; so ist das Plastom von *Epifagus virginiana* z.B. nur 70 kB lang (Wolfe *et al.* 1992). Beide Stränge der doppelsträngig vorliegenden DNA enthalten Informationen für unterschiedliche Gene (siehe Abbildung 1). Als Erklärung für die Polyploidie der Plastiden wurde vorgeschlagen, daß durch die Erhöhung der Kopienzahl des Plastoms die ribosomalen Gene vermehrt werden, weil im Laufe der Plastidenentwicklung ein erhöhter Bedarf an plastidären Ribosomen gedeckt werden muß (Bendich 1987). Das würde erklären, warum die Plastomkopienzahl während der Entwicklung einer Pflanze und nach dem Transferieren von im Dunkeln gewachsenen Pflanzen ins Licht besonders erhöht wird (Cannon *et al.* 1985). Außerdem scheint der ständige Austausch zwischen den Chromosomen einen sehr effektiven Reparaturmechanismus darzustellen; so ist auffällig, daß sämtliche Genomkopien einer Art identisch vorgefunden werden, etwaige Sequenzveränderungen also offenbar recht rasch eliminiert werden. Die homologe Rekombination, die dabei vonnöten ist und die man sich bei der Chloroplastentransformation zunutze macht, wird unter anderem von einem RecA-Homolog bewerkstelligt. Bei *Chlamydomonas*-Transformation mit dominantem, mutiertem RecA aus *E.coli* wurde tatsächlich eine reduzierte Überlebensrate nach Behandlung mit DNA-schädigenden Agenzien gefunden, wogegen das Wildtypallel von *E.coli* die Chloroplastenrekombination sogar 15-fach erhöhte (Cerutti *et al.* 1995).

Typische Strukturmerkmale sind zwei „inverted repeat“-Regionen (IR), die das Plastidenchromosom in eine kleine (SSC) und eine große Einzelkopieregion (LSC) unterteilen. Die IR-Regionen, die 6 bis 76 kB lang sind, enthalten unter anderen die rRNA-Gene, die damit in jeder Kopie des Plastoms doppelt vorliegen. Plastomgrößenunterschiede zwischen einzelnen Arten sind meist auf die Länge der IR-Regionen zurückzuführen (Maier *et al.* 1995). Die IR-Regionen tragen mit hoher Wahrscheinlichkeit zur Stabilität des Plastoms bei. Bei Pflanzenarten, die ihre IRs verloren haben, ist eine erhöhte Sequenzumlagerung gegenüber verwandten Arten, die ihre IRs noch besitzen, zu beobachten (Palmer & Thompson 1982). Durch intramolekulare Rekombination kann es im IR-Bereich zur Ausbildung von Inversionsisomeren kommen, die sich in der Orientierung ihrer beiden Einzelkopieregionen unterscheiden (Stein *et al.* 1986).

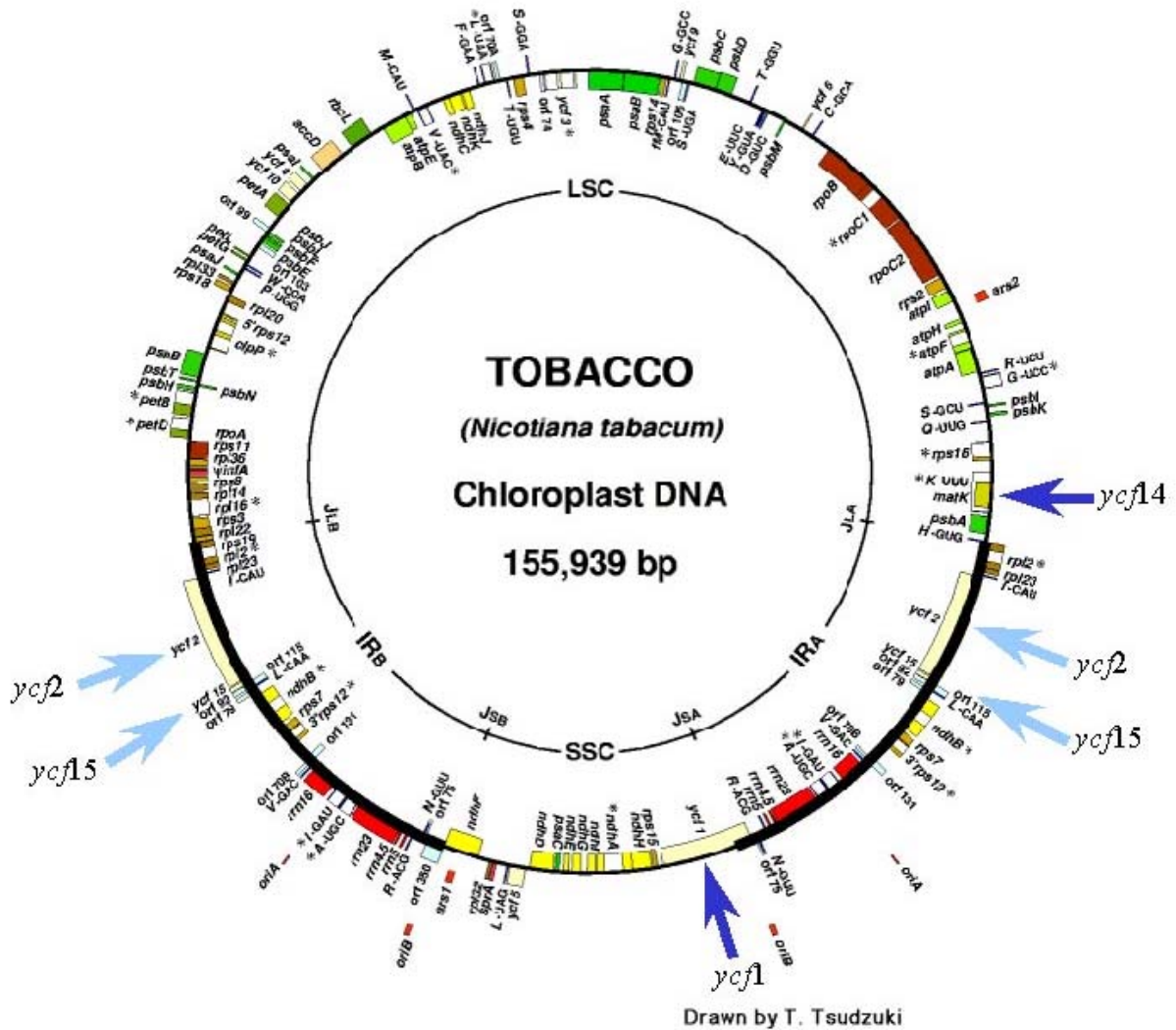


Abbildung 1: Genkarte des Tabakplastidenchromosoms

Beide Stränge des doppelsträngigen zirkulären Genoms enthalten unterschiedliche Gene. In der Genkarte wird das dadurch angedeutet, daß die als Kästen eingezeichneten Gene, die auf dem inneren Strang abgelesen werden, nach innen reichen und die auf dem äußeren Strang nach außen. Der innere Strang wird im Uhrzeigersinn abgelesen, der äußere gegen den Uhrzeigersinn. Die verschiedenen Farben der Kästen ordnen die Gene nach der Funktion ihrer Produkte.

Bei den mit blauen Pfeilen gekennzeichneten Genen handelt es sich um die in Kapitel 1.4.4 besprochenen „neuen“ Gene. Die dunkelblauen Pfeile zeigen die im Zuge dieser Arbeit untersuchten Gene.

1.4 Im Lauf der Evolution hinzu gewonnene Eigenschaften

Entgegen dem Verlusttrend (wie die 30-fache Reduktion des Plastoms im Vergleich zum Genom der Cyanobakterien, siehe Kapitel 1.2) gibt es auch eine Reihe neuer Eigenschaften, die wahrscheinlich im Laufe der Plastidenevolution hinzu gewonnen wurden: RNA-Edierung, Verbreitung von Introns, die nukleär kodierte RNA-Polymerase der Plastiden (NEP) und einige wenige Gene unbekannter Herkunft (*ycf1/2/14/15*), worauf in den folgenden Kapiteln näher eingegangen werden soll.

1.4.1 RNA-Edierung

Unter RNA-Edierung versteht man Prozesse (ko- oder posttranskriptionell), die die Nukleotidsequenz eines mRNA-Moleküls im Vergleich zur Sequenz des korrespondierenden Gens verändern. RNA-Edierung wurde 1986 bei mitochondrialen Transkripten von Trypanosomen entdeckt (Benne *et al.* 1986). RNA-Edierung wurde bisher nur in Eukaryoten gefunden und kann Insertion, Deletion und Substitution von Nukleotiden umfassen. In Plastiden finden meist C-U-Substitutionen statt; Ausnahme ist bislang lediglich das Hornmoos *Anthoceros formosae*, wo hauptsächlich U zu C ediert wird (Yoshinaga *et al.* 1996). Dagegen sind in Mitochondrien, wo auch um ein Vielfaches mehr Edierungsstellen zu finden sind, die beide Typen beschrieben (z.B. Giege & Brennicke 1999). Die vergleichsweise seltene RNA-Edierung in Plastiden wurde durch das Fehlen eines Startkodons beim *rpl2*-Gen in Mais entdeckt. Das war der erste bekannte Fall von Edierung, bei der ein ACG-Kodon in ein AUG-Startkodon umgewandelt wird, der Beginn eines Leserasters also aus der DNA-Sequenz nicht erkennbar ist (Hoch *et al.* 1991). Bei Pflanzen tritt RNA-Edierung erstmals auf der Stufe der Bryophyten auf (Malek *et al.* 1996, Freyer *et al.* 1997), betrifft also lediglich Land-pflanzen und ist daher phylogenetisch jünger als das Spleißen von Introns (siehe Kapitel 1.4.2). Auffällig ist dabei, daß RNA-Edierung bei einer Spezies entweder gemeinsam in Plastiden und Mitochondrien auftritt oder in keiner der beiden Organellen; auch ist RNA-Edierung in Mitochondrien weitaus häufiger anzutreffen als in Plastiden, was annehmen läßt, daß sie dort zuerst aufgetreten ist (Maier *et al.* 1996).

Üblicherweise dient das Edieren der Wiederherstellung von Kodons konservierter Aminosäuren (Maier *et al.* 1992), in einigen Fällen wird auch das Schaffen von Start- (Hoch *et al.* 1991, Wakasugi *et al.* 1996) und Stoppkodons beobachtet (Wakasugi *et al.* 1996). In intergenischen Regionen kann ebenfalls von einem Wiederherstellen von konservierten Nukleo-

tiden ausgegangen werden, wenn man annimmt, daß die Edierungsstellen, die sich immer unweit eines Startkodons befinden, für eine bestimmte Sekundärstruktur der mRNA verantwortlich zeichnen, die eine Translation erst ermöglicht (Kudla & Bock 1999, Drescher *et al.* 2002). Die Notwendigkeit von RNA-Edierung zur Ermöglichung von Transkription wurde im Fall der *rpoA*-Edierung diskutiert, die in verschiedenen Geweben unterschiedlich stark erfolgt (Hirose *et al.* 1999). Dies legt die Möglichkeit der plastidären Transkriptionsregulierung durch kernkodierte Edierungsfaktoren nahe. Nur in einem einzigen Fall wurde sogenanntes „Silent editing“ beschrieben, das Edieren einer dritten Kodonposition, wodurch sich die Aminosäuresequenz nicht verändert (Hirose *et al.* 1996). Untypischerweise (Edierung wird oft noch in mehreren Arten an gleicher Position gefunden) wurde diese Stelle nur in einer Spezies gefunden.

RNA-Edierung ist abhängig von (kernkodierten) *trans*-Faktoren (Chaudhuri *et al.* 1995, Bock & Koop 1997), spezifischen *cis*-Sequenzen (Bock *et al.* 1996 und 1997, Hermann & Bock 1999) und in einigen Fällen von der Plastidentranslation (Karcher & Bock 1998), wobei auch die Translation von erfolgreichem Edieren (zu einem Startkodon) abhängig sein kann (Hoch *et al.* 1991, Kudla *et al.* 1992, Hirose & Sugiura 1997). In manchen Fällen scheint das Spleißen eines benachbarten Introns Voraussetzung für erfolgreiches Edieren zu sein (Schmitz-Linneweber *et al.* 2001-b), in anderen Fällen erfolgt es jedoch unabhängig von Spleißvorgängen bzw. vorher (Freyer *et al.* 1993, Ruf *et al.* 1994). Allerdings kann wiederum auch das Spleißen vom vorherigen Edieren abhängen (Börner *et al.* 1995).

Darüber hinaus ist zu beachten, daß RNA-Edierung entwicklungs-, gewebespezifisch (Bock *et al.* 1993, Ruf & Kössel 1997) und umweltabhängig sein kann. So wurde z.B. gezeigt, daß das Edieren einer Stelle innerhalb des *ndhB*-Gens abhängig von Photosynthese (Karcher & Bock 2002-a) und temperatursensitiv ist (Karcher & Bock 2002-b). RNA-Edierung kann auch zur Artbildung beitragen. Unterschiede hinsichtlich der Ausstattung der plastidären Genome mit Edierungsstellen wurden auch bei nah Verwandten schon früh bemerkt (Freyer *et al.* 1995, Wakasugi *et al.* 1996). Anhand von Tabak und *Atropa* wurden speziesspezifische plastidäre „Editotypen“ (Muster aller plastidärer Edierungsstellen) nah verwandter Spezies bestimmt (Schmitz-Linneweber *et al.* 2002). Die Anzahl kernkodierter Edierungsfaktoren kann die zur Edierung der plastidären Position benötigten Faktoren übertreffen. Im Fall des allotetraploiden Tabaks sind vom „Vater“ *Nicotiana tomentosiformis* noch *trans*-Faktoren für Edierungsstellen vorhanden, die von den Plastiden, die von der „Mutter“ *Nicotiana glauca* abstammen, nicht benötigt werden (Schmitz-Linneweber *et al.* 2001-b). Als edierendes Enzym konnte in Mitochondrien von Wirbeltieren unter anderem eine Cytidindesaminase

identifiziert werden (Sowden *et al.* 2002). Im Kerngenom von *Arabidopsis* wurden Gene für Cytidindesaminasen pro-karyotischen Ursprungs identifiziert, die allerdings kein Transitpeptid für die Organellen und keine Affinität zu RNA aufweisen (Faivre-Nitschke *et al.* 1999).

Eine vielversprechende neue Möglichkeit zur Erforschung von Mechanismen der RNA-Edierung stellt das 2001 von Hirose und Sugiura entwickelte *in vitro* Edierungssystem für Tabakchloroplasten dar, welches kürzlich auch auf Erbsenchloroplasten übertragen werden konnte (Miyamoto *et al.* 2002).

1.4.2 Introns

Introns sind meist nichtkodierende Bereiche innerhalb von Genen, die vor der Translation durch Spleißen entfernt werden müssen, um ein korrektes Transkript zu erhalten. Es gibt drei Haupt-gruppen (I – III), die durch unterschiedliche Spleißmechanismen entfernt werden. Die ältesten Introns scheinen die der Gruppe I zu sein, die zu Beginn ihrer Evolution nur in tRNAs vor-kamen (Cavalier-Smith 1991, Besendahl *et al.* 2000). Introns in Bakterien sind äußerst selten, und bis auf wenige Ausnahmen (Gruppe II) der Gruppe I zugehörig, wogegen in Plastiden höherer Pflanzen nur ein Gruppe I-Intron (*trnL*) vorgefunden wird (Ferat & Michel 1993). Dort herrschen Gruppe II-Introns vor, die nach ihrer Feinstruktur weiter in IIA und IIB unterteilt werden können (Barkan & Goldschmidt-Clermont 2000).

Allgemein scheinen sich Introns erst nach erfolgter Endosymbiose in den Zellorganellen auch in für Proteine kodierende Gene ausgebreitet zu haben. Durch den bereits erwähnten Transfer der meisten Organellengene in den Nukleus (Kapitel 1.2) wurden dort schließlich auch Introns eingeführt. Da in diesem Fall jedoch eine Trennung von Transkription und Translation vorliegt (die Ribosomen befinden sich außerhalb des Nukleus), konnte das langsamere spleißosomale Spleißen (Gruppe III) entwickelt werden (Cavalier-Smith 1991, Lambowitz & Belfort 1993). Am wahrscheinlichsten ist, daß sich in den Vorfahren von Plastiden und Mitochondrien die ersten wenigen Introns entwickelten, sich in den Zellorganellen vermehrt und dabei in den eukaryotischen Zellen ausgebreitet haben. Dabei ging auch die Notwendigkeit zum Selbstspleißen verloren und Proteine und RNAs wurden in den Spleißprozeß eingeführt (Lambowitz & Belfort 1993).

1.4.3 Die nukleär kodierte RNA-Polymerase der Plastiden (NEP)

Das Plastidengenom enthält die Gene für vier Untereinheiten einer eubakteriellen RNA-Polymerase (*rpoA/B/C1/C2* für die Untereinheiten $\alpha/\beta/\beta'/\beta''$, Hu & Bogorad 1990, Hu *et al.* 1991). Als regulierende Untereinheiten dazu wurden im Kerngenom von *Arabidopsis* sechs σ -Faktoren identifiziert (Kanamaru *et al.* 1999, Fujiwara *et al.* 2000), von denen sich drei als lichtabhängig erwiesen (Isono *et al.* 1997), einer sogar als spezifisch blaulichtabhängig (Tsunoyama *et al.* 2002). Ebenso kennt man drei σ -Faktoren aus Mais (Tan & Troxler 1999, Lahiri & Allison 2000), von denen sich einer als lichtabhängig erwies (Lahiri *et al.* 1999), drei aus Senf (Tiller *et al.* 1991, Kestermann *et al.* 1998) und einen aus der Rotalge *Cyanidium caldarium* (Liu & Troxler 1996). Kürzlich wurden auch σ -Faktoren bindende Proteine beschrieben (Morikawa *et al.* 2002).

Neben dieser zu Cyanobakterien homologen plastidär kodierten RNA-Polymerase (PEP), wurde in Plastiden noch eine zweite aktive RNA-Polymerase entdeckt, die kernkodiert ist (NEP). Deren Nachweis erfolgte zunächst indirekt: In den ribosomenfreien Plastiden der Gerstenmutante *albostrians* konnte Transkriptionsaktivität nachgewiesen werden (Hess *et al.* 1993 und 1994-a/-b), ebenso in Plastiden von *Epifagus virginiana*, denen *rpo*-Gene fehlen (dePamphilis & Palmer 1990, Morden *et al.* 1991) und in transgenen *rpoB*-Deletionsmutanten von Tabak (Allison *et al.* 1996). Schließlich ist auch das Gen für eine kernkodierte RNA-Polymerase kloniert worden (Hedtke *et al.* 1997, Weihe *et al.* 1997). Sie ähnelt dem aus einer Einheit bestehenden Enzym von Bakteriophagen und scheint auf Duplikation des Gens für die mitochondriale (kernkodierte) RNA-Polymerase zurückzugehen (Hedtke *et al.* 1997). In *Arabidopsis thaliana* kennt man inzwischen drei nukleär kodierte RNA-Polymerasen vom Phagentyp, wobei eine (RpoT;1) in Mitochondrien importiert wird, eine weitere (RpoT;3) in Plastiden und die dritte (RpoT;2) in beide Organellen gelangt, wie durch Fusion der Transitpeptide mit dem GFP-Gen gezeigt werden konnte (Hedtke *et al.* 1999 und 2000). Kürzlich wurde außerdem das Vorhandensein einer zweiten nukleär kodierten RNA-Polymerase für Plastiden, NEP-2 genannt, postuliert (Bligny *et al.* 2000), die vor allem in jungen Zellen gefunden wird und ausschließlich für das rRNA-Operon verantwortlich zu sein scheint. Sie ist wie NEP und im Gegensatz zur PEP nicht Tagetin-sensitiv, wird nicht durch Spectinomycin gehemmt und erkennt den T7-Promotor, jedoch reagieren anti-NEP-Antikörper nicht auf NEP-2-haltige Lösungen, dafür konnte für NEP-2 Abhängigkeit von einem spezifischen Transkriptionsinitiationsfaktor nachgewiesen werden.

Nachdem, wie erwähnt, unter anderem durch PEP-defiziente Mutanten nachgewiesen werden konnte, daß Transkription auch ohne die plastidäre RNA-Polymerase stattfindet, wurde zunächst ein Modell postuliert, welches davon ausgeht, daß zu Beginn der Plastidenentwicklung, in der Proplastidenphase, zunächst nur die NEP-Polymerase aktiv ist, um „housekeeping genes“ und die *rpo*-Gene abzulesen. Im Chloroplastenstadium soll dann die PEP-Polymerase für photosynthetische und „housekeeping“-Gene zuständig sein, während die NEP nur noch die *rpo*-Gene transkribiert (Hajdukiewicz *et al.* 1997). Inzwischen erscheint das Bild jedoch um einiges komplexer, so werden z.B. alle Operons auch dann transkribiert, wenn nur die NEP-Polymerase funktioniert, auch wenn Transkriptionsraten im Vergleich zum Wildtyp erheblich variieren können (Krause *et al.* 2000, Legen *et al.* 2002). Es müssen also posttranskriptionelle Prozesse in die Überlegungen miteinbezogen werden. Parallelen von diesen in Tabak erfolgten Untersuchungen, können auch zu den ribosomendefizienten Mutanten monokotyledoner Pflanzen gezogen werden. Die Maismutante *iojap* wurde auf ihre NEP-Aktivität hin überprüft, indem NEP-Promotoren gesucht und gefunden wurden (Silhavy & Maliga 1998).

Den unterschiedlichen RNA-Polymerasen entsprechend existieren nämlich in einem Plastom auch unterschiedliche Promotorentypen: Zunächst wurden typische bakterielle -10 und -35 Promotoren gefunden (Gruissem & Tonkyn 1993), inzwischen kennt man auch Konsensussequenzen für NEP-Promotoren (Weihe & Börner 1999), die dritte Promotorgruppe vom „non-consensus“-Typ (NC, Kapoor *et al.* 1997) könnte von NEP-2 verwendet werden (Bligny *et al.* 2000). Vor einem einzigen Gen befinden sich zuweilen mehrere verschiedene Promotoren, die auch unterschiedlich induzierbar sein können (Lübberstedt *et al.* 1994). Besonders gut untersucht ist ein durch Blaulicht induzierter Promotor vor dem *psbD*-Gen, auf den in Kapitel 4.1.3 noch näher eingegangen wird (Sexton *et al.* 1990, Allison & Maliga 1995).

1.4.4 Neue Gene?

Inzwischen ist es gelungen, einen großen Teil pflanzlicher Gene ihrem Ursprung zuzuordnen (Martin *et al.* 1998). Auffällig dabei ist, daß eine kleine Gruppe plastidärer offener Leseraster sich außerhalb der prokaryotischen Vererbung befindet. Daher muß zum derzeitigen Kenntnisstand angenommen werden, daß es sich bei ihnen um im Laufe der Plastiden-evolution neu hinzu gewonnene Gene handelt:

- *ycf1* – Trotz einer Länge von 5.706 Bp zeigt dieses extrem schwach transkribierte Gen mit herkömmlichen Methoden keine signifikanten Homologien zu Genen anderer Organismen. Mit PSI-BLAST konnte es letztthin jedoch einem ABC-Transporter zugeordnet werden (De Las Rivas *et al.* 2002). Eine Zusammenfassung des aktuellen Kenntnisstandes zu diesem Gen ist in Kapitel 4.1.1 enthalten. Im „knock-out“-Experiment erwies sich das Genprodukt als essentiell für das Überleben der Plastide (Drescher *et al.* 2000).
- *ycf2* – Bei einer Länge von 6.843 Bp wurde lediglich ein 130 Aminosäuren umfassendes Stück gefunden, welches homolog zu ATP-Bindestellen von ATPasen der FtsH/CDC48-Familie ist (Wolfe 1994). Im „knock-out“-Experiment erwies sich das Genprodukt als essentiell für das Überleben der Plastide (Drescher *et al.* 2000).
- *ycf14* – Bei einer Länge von 1.530 Bp weist es eine signifikante Homologie zur Domäne X mitochondrialer Intronmaturasen auf (Details siehe Kapitel 4.2.1) und befindet sich im Intron von *trnK*. So findet man für *ycf14* auch oft den Namen *matK* (Maturase von *trnK*, Wolfe *et al.* 1992) Abgesehen von der zentralen X-Domäne, in der sich auch eine hoch konservierte Edierungsstelle befindet, handelt es sich bei *ycf14* um das variabelste Plastidengen (Vogel *et al.* 1997, Young & dePamphilis 2000), weswegen es einen beliebten phylogenetischen Marker darstellt (Hilu & Alice 1999, Hu *et al.* 2000, Fuse & Tamura 2000).
- *ycf15* – Dieses 264 Bp lange Leseraster ist wahrscheinlich kein funktionelles Gen (Schmitz-Linneweber 2001-a).

1.5 Aufgabenstellung

Mittels reverser Genetik gelang es, die Funktionen der meisten plastidären, offenen Leseraster aufzuklären (unter anderen *ycf3* – Ruf *et al.* 1997, *ycf6* – Hager *et al.* 1999, *ycf9* - Ruf *et al.* 2000 und Swiatek *et al.* 2001). Bemerkenswerterweise sind es gerade die in Kapitel 1.4.4 erwähnten Gene außerhalb der prokaryotischen Vererbung, die sich bisher noch ihrer Enthüllung entziehen.

Im Laufe der vorliegenden Arbeit sollten neue Erkenntnisse bezüglich dieser wahrscheinlich im Lauf der Plastidenevolution neu hinzu gekommenen Gene gewonnen werden: Die Funktion von *ycf1* und *ycf14* sollte durch verschiedene Ansätze (zunächst die Strategie der reversen Genetik) erhellt werden.

Als Beitrag zur Erforschung der in Plastiden ebenfalls evolutionär neu hinzu gewonnenen RNA-Edierung sollte eine Edierungsstelle im nichtkodierenden Bereich vor dem *ndhG*-Gen einiger Monokotyledonen phylogenetisch untersucht sowie mit Hilfe von Transposon-induzierten Maismutanten versucht werden, nukleär kodierte Edierungsfaktoren zu identifizieren.

2 Material und Methoden

Soweit nicht anders angegeben, wurden die verwendeten Chemikalien von den Firmen Carl Roth GmbH (Karlsruhe), Merck KG (Darmstadt), Serva Elektrophoresis GmbH (Heidelberg) und Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim) bezogen.

Das verwendete Wasser wurde aus einer Seradest Beta75 Seralpur Delta Anlage von Seral Reinstwasser-Systeme (Ransbach-Baumbach) entnommen.

Folgende Zentrifugen fanden Verwendung: Sigma 4K15 C, Sigma 2 MK, Sigma 201 M (Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz) und Beckman AvantiTM J-25 (BeckmanCoulter, Unterschleissheim-Lohhof).

Gentechnisch veränderte Organismen oder Teile von ihnen wurden nach Beendigung der Experimente bei 2 bar und 120 °C für 20 min autoklaviert (im Dampfsterilisator Varioklav® Typ 500, H+P Labor-technik, München oder in kleineren Mengen im WMF-Schnelltopf® Perfect, Geislingen).

2.1 Isolierung von Nukleinsäuren

2.1.1 Isolierung von Gesamtnukleinsäuren

(nach Doyle & Doyle 1990)

Blattstücke wurden in flüssigem Stickstoff fein zermörsert und dann in Extraktionspuffer mindestens 30 min bei 60 °C inkubiert. Danach erfolgten mindestens zwei Chloroform/Isoamylalkohol (24:1)-Extraktionen (mit 2/3 bis 1 Volumen der Extraktionspuffermenge, siehe Kapitel 2.2.2). Im Anschluß wurde eine Isopropanol-Fällung mit 2/3 Volumen Isopropanol (siehe Kapitel 2.3) durchgeführt.

Die dabei sedimentierte DNA wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, abzentrifugiert (10 min, 4 °C, 10.000 × g), getrocknet und in H₂O gelöst.

Extraktionspuffer: 2 % CTAB (2 g/100 ml)
 1,4 M NaCl (28 ml/100 ml)
 20 mM EDTA (4 ml 0,5 M/100 ml)
 100 mM Tris/HCl pH 8 (10 ml 1 M/100 ml)
 100 mM β-Mercaptoethanol frisch dazu (je 10 µl/ml)
 (Sterilisation durch Aufkochen in der Mikrowelle)

2.1.2 Isolierung von Gesamt-RNA

(nach Protokoll des TRIzol- bzw. TriFast-Herstellers)

Blattstückchen wurden in flüssigem Stickstoff fein zermörsert und mit TRIzol (GibcoBRL, Eggenstein) bzw. peqGOLD TriFast™ (peqlab, Erlangen) 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte eine Chloroformextraktion (mit 1/5 Volumen der TRIzol- bzw. TriFast-Menge, siehe Kapitel 2.2.1) und eine Isopropanol-Fällung mit 1/2 Volumen Isopropanol. Nach gründlichem Mischen und zehnminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde 10 min bei $12.000 \times g$ und $4 \text{ }^\circ\text{C}$ zentrifugiert. Die dabei sedimentierte RNA wurde mit 75 % Ethanol gewaschen, abzentrifugiert (5 min, $4 \text{ }^\circ\text{C}$, $7.500 \times g$), kurz (!) luftgetrocknet und in H_2O gelöst.

2.1.3 Isolierung von Plasmid-DNA

(nach Birnboim & Doly 1979)

1,5 ml von über Nacht gewachsenen Bakterienkulturen ($37 \text{ }^\circ\text{C}$, Schüttler Modell Kühner, B. Braun, Melsungen) wurden abzentrifugiert (1 min, $10.000 \times g$, RT) und mit 200 μl Lösung 1 gemischt. Nach Zugabe von 200 μl Lösung 2 wurde 5 min bei Raumtemperatur und nach Zugabe von 200 μl Lösung 3 wurde dann 10 bis 15 min auf Eis inkubiert. Nach zehnminütiger Zentrifugation ($4 \text{ }^\circ\text{C}$, $15.000 \times g$) wurde mit 0,7 Volumen Isopropanol gefällt (siehe Kapitel 2.3.1). Das DNA-haltige Sediment wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, abzentrifugiert (10 min, $4 \text{ }^\circ\text{C}$, $10.000\text{-}12.000 \times g$), luftgetrocknet und in 50 μl H_2O gelöst.

Lösung 1: (Lagerung bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$)	50 mM Tris/HCl, pH 8 (2,5 ml 1 M/50 ml) 10 mM EDTA, pH 8 (1 ml 0,5 M/50 ml) 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNase A
---	---

Lösung 2: (frisch hergestellt)	0,2 N NaOH (250 μl 2 N/2,5 ml) 1 % SDS (125 μl 20 %/2,5 ml)
-----------------------------------	--

Lösung 3:	3 M Kaliumacetat, pH 4,8 – 5,5
-----------	--------------------------------

2.1.4 DNA-Isolierung mit dem Qiagen Plasmid Purification Kit

(nach Anleitung des Herstellers Qiagen, Hilden)

Nach alkalischer Lyse wurden die wasserlöslichen Bestandteile der Bakterienzellen auf eine Anionen-Austauscher-Säule (Säulentypen Tip 20 - 500, je nach Menge der Ausgangskultur) aufgetragen, auf der Plasmid-DNA zunächst bindet, während RNA, Proteine und andere Verunreinigungen mit einem Waschpuffer mittlerer Salzkonzentration eluieren. In einem anschließenden Schritt wird die Plasmid-DNA mit einem Elutionspuffer mit hoher Salzkonzentration von der Säule eluiert und mit Isopropanol gefällt (siehe Kapitel 2.3.1).

2.2 Reinigung von Nukleinsäuren

(nach Sambrook *et al.* 1989, Sambrook & Russell 2001)

2.2.1 Chloroformextraktion

Zur Entfernung von Proteinen aus wäßrigen Lösungen wurden Chloroformextraktionen durchgeführt, bis keine Zwischenphase mehr zu erkennen war. Nach Zugabe von 1/5 bis 1 Volumen Chloroform (bezogen auf die Ausgangsmenge an zu reinigender Nukleinsäurelösung) wurde nach gründlichem Mischen 10 min bei 10 °C und $10.000 \times g$ zentrifugiert. Es bildeten sich zwei Phasen, eine organische Unterphase und eine wäßrige Oberphase, die die Nukleinsäuren enthielt und weiterverarbeitet wurde. Die Zwischenphase enthält hauptsächlich Polypeptide, da diese sowohl hydrophile als auch hydrophobe Abschnitte aufweisen.

2.2.2 Chloroform/Isoamylalkohol (24:1)-Extraktion

Zur Entfernung von Proteinen aus wäßrigen Lösungen und/oder zur Entfernung von Phenolresten und anderen Verunreinigungen wurden Chloroform/Isoamylalkohol (24:1)-Extraktionen durchgeführt, bis keine Zwischenphase mehr zu erkennen war. Nach Zugabe von 2/3 oder 1 Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) (bezogen auf die Ausgangsmenge an zu reinigender Nukleinsäurelösung) wurde nach gründlichem Mischen 10 min bei 10 °C und $10.000 \times g$ zentrifugiert. Es bildeten sich die oben beschriebenen zwei Phasen (Kapitel 2.2.1). Eventuelle Phenolreste befanden sich in der organischen Unterphase. Die wäßrige Oberphase mit den Nukleinsäuren wurde weiterverarbeitet.

2.3 Fällung von Nukleinsäuren

(nach Sambrook *et al.* 1989, Sambrook & Russell 2001)

2.3.1 Isopropanolfällung

Um Nukleinsäuren zu konzentrieren oder von Salzen zu befreien, wurde eine Isopropanolfällung durchgeführt. Die Isopropanolfällung erfolgte mit 2/3 oder 1 Volumen 100 % Isopropanol. Nach gründlichem Mischen wurde 20 min bei 4 °C und $10.000 \times g$ zentrifugiert. Das danach erhaltene Sediment wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, abzentrifugiert (10 min, 4 °C, $10.000-12.000 \times g$), luftgetrocknet und in H₂O gelöst.

2.3.2 Natriumacetatfällung

Zur Konzentrierung von Nukleinsäuren wurde im Regelfall eine Natriumacetatfällung durchgeführt. Diese erfolgte mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5) und 2,5 Volumen 100 % Ethanol. Nach gründlichem Mischen wurde 20 – 30 min bei 4 °C und 15.000 × g zentrifugiert. Die sedimentierten Nukleinsäuren wurden mit 70 % Ethanol gewaschen, abzentrifugiert (10 min, 4 °C, 15.000 × g), luftgetrocknet und in H₂O gelöst.

2.3.3 Ammoniumacetatfällung

Um PCR-Produkte für die Sequenzierung (siehe Kapitel 2.9) vorzubereiten, wurde der PCR-Ansatz mit H₂O auf 100 µl aufgefüllt, 100 µl 4 M Ammoniumacetat und 600 µl 100 % Ethanol zugegeben und 1 - 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde 30 min bei 20 °C und 12.000 × g zentrifugiert, mit 70 % Ethanol gewaschen und das Sediment in der Hälfte des Ausgangsvolumens H₂O resuspendiert. Bei der Fällung mit Ammoniumacetat bleiben kleinere Nukleinsäurestücke wie PCR-„Primer“ in Lösung, die sonst die Sequenzierungsreaktion behindern würden, indem sie mit dem für die Sequenzierung eingesetzten „Primer“ konkurrieren. Beim LI-COR-System ist eine Fällung nicht nötig, da dort mit markierten „Primern“ sequenziert wird (siehe Kapitel 2.9.2).

2.4 Enzymatische Modifizierung von Nukleinsäuren

2.4.1 DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

(nach Anleitung der Hersteller, Sambrook *et al.* 1989, Sambrook & Russell 2001)

Die Reaktionen erfolgten nach Angaben der Hersteller der Restriktionsendonukleasen in den mitgelieferten 10×-Puffern und je nach Bedarf unter Zusatz von BSA (10 mg/ml, New England Biolabs Inc., USA). Die verwendeten Enzyme wurden, soweit nicht anders angegeben, von MBI Fermentas (St. Leon-Rot) oder New England Biolabs Inc. (USA) bezogen.

Enzym	Herkunft	Erkennungssequenz
<i>Acc65I</i>	<i>Acinetobacter aceti</i> 655	5'-G [^] G T A C C-3' 3'-C C A T G [^] G-5'
<i>BamHI</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H	5'-G [^] G A T C C-3' 3'-C C T A G [^] G-5'
<i>BpiI</i>	<i>Bacillus pumillus</i> Sw 4-3	5'-G A A G A C (N) ₂ [^] -3' 3'-C T T C T G (N) ₆ [^] -5'
<i>BspEI</i>	<i>E. coli</i> mit <i>BspEI</i> -Gen von <i>Bacillus</i> (H. Kong)	5'-T [^] C C G G A-3' 5'-A G G C C [^] T-3'
<i>DpnI</i>	<i>E. coli</i> mit <i>dpnIR</i> -Gen von <i>Diplococcus pneumoniae</i> G41	CH ₃ 5'-G A [^] T C-3' 3'-C T [^] A G-5'
<i>Ecl136II</i>	<i>Enterobacter cloacae</i> RFL136	CH ₃ 5'-G A G [^] C T C-3' 3'-C T C [^] G A G-5'
<i>Eco32I</i>	<i>Escherichia coli</i> RFL32	5'-G A T [^] A T C-3' 3'-C T A [^] T A G-5'
<i>EcoRI</i>	<i>E. coli</i> mit <i>ecoRIR</i> -Gen von <i>Escherichia coli</i> RY13	5'-G [^] A A T T C-3' 3'-C T T A A [^] G-5'
<i>HincII</i>	<i>Haemophilus influenzae</i> Rc	5'-G T P ^y [^] P ^u A C-3' 3'-C A P ^u [^] P ^y T G-5'
<i>HindIII</i>	<i>Haemophilus influenzae</i> Rd	5'-A [^] A G C T T-3' 3'-T T C G A [^] A-5'
<i>NdeI</i>	<i>Neisseria denitrificans</i>	5'-C A [^] T A T G-3' 3'-G T A T [^] A C-5'
<i>PstI</i>	<i>Providencia stuarti</i>	5'-C T G C A [^] G-3' 3'-G [^] A C G T C-5'
<i>PvuII</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	5'-C A G [^] C T G-3' 3'-G T C [^] G A C-5'
<i>SacI</i>	<i>Streptomyces achromogenes</i>	5'-G A G C T [^] C-3' 3'-C [^] T C G A G-5'
<i>SacII</i>	<i>Streptomyces lividans</i> mit <i>SacII</i> -Gen von <i>Streptomyces achromogenes</i> (ATCC 12767)	5'-C C G C [^] G G-3' 3'-G G [^] C G C C-5'
<i>Scal</i>	<i>Streptomyces caespitosus</i>	5'-A G T [^] A C T-3' 3'-T C A [^] T G A-5'
<i>SpeI</i>	<i>E. coli</i> mit <i>SpeI</i> -Gen von <i>Sphaerotilus</i> (ATCC 13923)	5'-A [^] C T A G T-3' 3'-T G A T C [^] A-5'
<i>XbaI</i>	<i>Xanthomonas badrii</i>	5'-T [^] C T A G A-3' 3'-A G A T C [^] T-5'
<i>XmaI</i>	<i>E. coli</i> mit <i>XmaI</i> -Gen von <i>Xanthomonas malvacearum</i> (ATCC 9924)	5'-C [^] C C G G G-3' 3'-G G G C C [^] C-5'

Tabelle 1: Im Laufe der Arbeit verwendete Restriktionsendonukleasen

2.4.2 Restriktionsfragmentlängenpolymorphismusanalyse (RFLP)

(nach Sambrook *et al.* 1989, Sambrook & Russell 2001)

Nach DNA-Spaltung mit geeigneten Restriktionsendonukleasen kann transformierte von Wildtyp-plastiden-DNA unterschieden werden. Für den Bereich des Plastidenchromosoms, in den das Marker-gen (*aadA*) eingesetzt wurde, wurden radioaktiv markierte Sonden hergestellt (siehe Kapitel 2.13). Es wurden Restriktionsendonukleasen ausgewählt, für die nach Spaltung in diesem Bereich unterschiedlich lange Fragmente für Wildtyp und Transformante erwartet wurden. Eine Hybridisierung mit der entsprechenden Sonde lieferte Signale unterschiedlicher Größe (siehe Abbildung 8, Abbildung 16 und Abbildung 21).

2.4.3 Glätten von DNA-Enden mit dem Klenow-Enzym

(nach Sambrook *et al.* 1989, Sambrook & Russell 2001)

Wurden nach Spaltungen mit Restriktionsendonukleasen, deren Schnittstellen überhängende Enden („sticky ends“) hinterlassen, zur Ligation glatte Enden („blunt ends“) benötigt, wurde das Klenow-Enzym zum Auffüllen von Einzelstrangüberhängen verwendet, wenn die Enden für die DNA-Polymerase zugänglich waren (Syntheserichtung $5' \rightarrow 3'$). Dabei wurde in einem 20 μ l-Ansatz zunächst 0,5 μ l Klenow-Enzym (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, 10 u/ μ l) zur DNA-Lösung gegeben. Nach 2 min Inkubation bei 37 °C wurde 2 μ l dNTP-Mix (2,5 mM pro Desoxyribonukleosidtriphosphat) dazugegeben und weitere 15 min bei 37 °C inkubiert. Durch eine zehnminütige Inkubation bei 80 °C wurde die Reaktion durch Denaturierung des Enzyms abgestoppt.

2.4.4 Dephosphorylierung von DNA-Enden

(nach Seeburg *et al.* 1977)

Um eine Religation passender DNA-Enden zu verhindern, wurden diese nach der Spaltung mit Restriktionsendonukleasen (siehe Kapitel 2.4.1) direkt im Restriktionspuffer mit 1 μ l alkalischer Phosphatase (shrimp, 1 u/ μ l, Boehringer, Mannheim) für 20 min bei 37 °C dephosphoryliert. Durch zehnminütige Denaturierung des Enzyms bei 80 °C wurde die Reaktion abgestoppt.

2.5 Ligation von DNA

(nach Anleitung des Herstellers MBI Fermentas, St. Leon-Rot)

Mit Restriktionsendonukleasen geschnittene DNA-Stücke wurden mit T4-DNA-Ligase und 10× Ligasepuffer in dazu passend geschnittene Plasmidvektoren ligiert. Inkubiert wurde in einem 10 µl-Ansatz mit 1 µl 10× Puffer und 1 µl T4-DNA-Ligase (2 u/µl) 2 - 12 h bei 15 °C oder 1 h bei Raumtemperatur. Durch zehnmünütige Denaturierung des Enzyms bei 80 °C wurde die Reaktion abgestoppt, was eine Erhöhung der Klonierungseffizienz um 50 % bewirken soll.

Je nach Klonierungsziel wurde zur Kontrolle ein Ansatz mit Vektor allein (ohne Insert-DNA) inkubiert, um die Menge an religiertem Vektor zu bestimmen. Die in die Ligation eingesetzten DNA-Mengen wurden nach folgender Formel bestimmt: (Länge Insert : Länge Vektor) × 3 × Vektormenge (meist ca. 25 – 50 ng) = Insertmenge.

Im Falle der gewünschten Ligation zweier nichtkompatibler Enden wurde ein Adaptor (siehe Kapitel 3.2.1) im Überschuß von 1/10 Volumen des Ligationsansatzes bei 1 µg/µl Konzentration eingesetzt.

Verwendete Plasmid-Vektoren:

- pBluescript® II KS- (Stratagene, Heidelberg)
- pBluescript® II SK+ (Stratagene, Heidelberg)
- pPCR-TA (Invitrogen, Karlsruhe, Holton & Graham 1991, Marchuk *et al.* 1991)
- pRSET5b (Invitrogen, Karlsruhe, Schoepfer *et al.* 1993)
- PQE-31 (Qiagen, Hilden)

2.6 Transformationstechniken

2.6.1 Transformation von Bakterien

2.6.1.1 Herstellung kompetenter Zellen (für Standardtransformationen)

(nach Cohen *et al.* 1972, Hanahan *et al.* 1991)

Über Nacht in RB-Medium kultivierte Bakterienzellen (*E.coli* XL1 blue, Stratagene, Heidelberg, 3 ml mit 10 µg/ml Tetracyclin) wurden 1:100 mit RB-Medium (mit 10 µg/ml Tetracyclin) verdünnt und bis zu einer optischen Dichte von OD₅₉₀ = 0,4 - 0,6 weiter kultiviert (Schüttler Modell Kühner, B. Braun, Melsungen). Nach Abzentrifugieren (5 min, 4 °C, 5.000 × g) wurde das Sediment in 0,4 Volumen (bezogen auf das ursprüngliche Kulturvolumen) eisgekühltem TFB-Puffer I resuspendiert. Nach fünfminütiger Inkubation auf Eis wurde erneut abzentrifugiert und das Sediment in 1/25 Volumen TFB-Puffer II gelöst. Nach weiteren 15 - 60 min Inkubation auf Eis wurden die Zellsuspensionen in 100 µl-Aliquots abgefüllt tiefgefroren (mit flüssigem Stickstoff schockgefroren) und bei -70 °C aufbewahrt.

RB-Medium:	5 g Hefeextrakt 10 g Pepton (USB, USA) 5 g NaCl 2 ml 1 N NaOH 20 ml 1 M MgSO ₄ mit H ₂ O auf 1 Liter aufgefüllt
TFB-Puffer I:	30 mM Kaliumacetat (3 ml 1 M/100 ml) 100 mM RbCl (1,2 g/100 ml) 10 mM CaCl ₂ (1 ml 1 M/100 ml) 50 mM MnCl ₂ (5 ml 1 M/100 ml) 15 % Glycerin pH 5,8 (mit Essigsäure eingestellt)
TFB-Puffer II:	10 mM MOPS (0,3 g/150 ml) 75 mM CaCl ₂ (11,25 ml 1 M/150 ml) 10 mM RbCl (0,2 g/150 ml) 15 % Glycerin pH 6,5 (mit 1 N KOH eingestellt)

2.6.1.2 Herstellung kompetenter Zellen (für die Überexpression) (nach Miller 1987)

500 µl einer Übernachtskultur des für die Überexpression von Proteinen zu transformierenden Bakterienstammes wurden in 50 ml LBG-Medium überführt und bis OD₅₅₆ = 0,3 – 0,5 weiter kultiviert (Schüttler Modell Kühner, B. Braun, Melsungen). Dann wurden die Bakterien 5 min bei 4 °C mit 4.000 × g abzentrifugiert, in 25 ml eisgekühltem 100 mM CaCl₂ resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Sediment in 3 – 5 ml 100 mM CaCl₂ resuspendiert und bis zu einer Woche bei 4 °C gelagert.

LBG-Medium:	5 g Hefeextrakt 10 g Pepton (USB, USA) 10 g NaCl 4 g Glucose mit H ₂ O auf 1 Liter aufgefüllt
-------------	--

Verwendete Bakterienstämme:	M15 (Qiagen, Hilden) SG13009 (Qiagen, Hilden; Gottesman <i>et al.</i> 1981) LysS (BL21 mit T7 Lysozym, Invitrogen, Karlsruhe) BL21 (Invitrogen, Karlsruhe; Studier & Moffat 1986)
-----------------------------	--

2.6.1.3 Bakterientransformation

(nach Hanahan 1983)

Für die Transformation kompetenter Bakterien (siehe Kapitel 2.6.1.1 und 2.6.1.2) wurden je 100 µl der in 100 mM CaCl₂ gelagerten Zellen eingesetzt bzw. einzelne Aliquots mit kompetenten Bakterienzellen auf Eis aufgetaut. Gemeinsam mit 10 µl einer Ligationsreaktion (siehe Kapitel 2.5) oder 1 µl Überexpressionsvektor (bei frisch vorbereiteten kompetenten Zellen zusätzlich noch ein Kontrolle ohne DNA) wurde inkubiert:

30 - 60 min auf Eis

1 min 42 °C (bzw. 5 min 37 °C)

2 min auf Eis.

Nachfolgend wurde der Reaktionsansatz in 400 µl LB-Medium überführt und 1 h bei 37 °C inkubiert, bevor auf LB-Amp-Platten (wahlweise mit je 60 µg/ml IPTG und X-Gal) je 100 µl und je nach erwarteter Transformationsrate auch noch die restlichen 400 µl getrennt ausplattiert wurde. Über Nacht bei 37 °C gewachsene Kolonien wurden einzeln gepickt und in LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin (oder LBG-Amp bzw. M9-Medium) weiter kultiviert (Schüttler Modell Kühner, B. Braun, Melsungen). Es erfolgte eine Blau-Weiß-Selektion der Klone, wenn diesbezüglich ein Unterschied zwischen religiertem Vektor und dem gewünschten Konstrukt zu erwarten war: in den verwendeten Vektoren ist der 5'-Bereich des *lacZ*-Gens enthalten, während in den verwendeten Bakterienstämmen der dazu passende 3'-Bereich exprimiert wird. Das Produkt des *lacZ*-Gens ist β-Galaktosidase, ein Enzym, das in Gegenwart des Induktors IPTG das Substrat X-Gal in ein Indolylderivat überführt, das an der Luft zu blauem 5,5-Dibrom-4,4-dichlorindigo oxidiert, was zu einer Blaufärbung der Bakterienkolonien führt. Wurde jedoch ein Insert erfolgreich in die „Multiple Cloning Site“ des Vektors integriert, kommt es zur Rasterverschiebung, und es kann kein funktionelles Enzym entstehen - die Bakterienkolonien bleiben weiß (Ullmann *et al.* 1967, Davies & Jacob 1968). In einem speziellen Ansatz mit transformierten Vektoren des Typs pQE (Qiagen, Hilden) wurde ein „Kolonieblot“ durchgeführt, um die erfolgreiche Expression des inserierten Gens zu überprüfen (siehe Kapitel 2.21.1).

LB-Medium:

5 g Hefeextrakt
10 g Pepton (USB, USA)
10 g NaCl
mit H₂O auf 1 Liter aufgefüllt

für LBG: Zusatz von 4 g Glucose

für LB-Amp: Zusatz von 1 ml Ampicillin-Lösung (100 mg/ml)

für Platten: Zusatz von 15 g Agar (Difco, USA)/l

M9-Medium (minimal):	1 g NH ₄ Cl
	3 g KH ₂ PO ₄
	6 g Na ₂ HPO ₄
	4 g Glucose
	mit H ₂ O auf 1 Liter aufgefüllt

2.6.2 Biolistische Transformation von Tabak

(nach Klein *et al.* 1987, 1988a-c, Svab *et al.* 1990)

Das Einbringen von Fremd-DNA in Plastiden gelang das erste Mal in der einzelligen Alge *Chlamydomonas reinhardtii*, die einen einzelnen Chloroplasten besitzt (Boynton *et al.* 1988). Durch Integration eines intakten *atpB*-Gens konnte hier einer *atpB*-Mutante zu Photosyntheseaktivität verholfen werden. Fremd-DNA wird durch homologe Rekombination ins Plastidengenom integriert (Staub & Maliga 1992, Maliga *et al.* 1994, Suzuki *et al.* 1997). Die sogenannte biolistische (biologisch + ballistisch) Transformation wird damit für Plastiden sogar präziser als Transformationen in den Zellkern, weil homologe Rekombination im Gegensatz zum Kerngenom im Plastom die Regel ist (Maliga *et al.* 1994, Rochaix 1995).

2.6.2.1 Partikelpräparation

60 mg Goldpartikel (\varnothing 0,6 μ m) wurden in 1 ml 100 % Ethanol aufbewahrt. Davon wurde pro Transformationsansatz 35 μ l (ca. 2 mg) in ein Reaktionsgefäß überführt, 10 Sekunden bei $10.000 \times g$ bei 4 °C zentrifugiert und das erhaltene Goldsediment in 1 ml sterilem H₂O resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (1 min, $14.000 \times g$, 4 °C) wurde das Goldsediment im Kühlraum (4 °C) in 25 μ l DNA-Lösung (ca. 25 μ l gereinigtes zu transformierendes Plasmid) resuspendiert. Danach wurden nacheinander 220 μ l steriles H₂O, 250 μ l 2,5 M CaCl₂ und 50 μ l 0,1 M Spermidin unter gründlichem Mischen dazu gegeben. Der gesamte Ansatz wurde noch weitere 10 min bei 4 °C kräftig geschüttelt. Die mit der DNA beladenen Goldpartikel wurden daraufhin abzentrifugiert und zwei mal mit 600 μ l Ethanol gewaschen und schließlich in 72 μ l Ethanol resuspendiert. Hiervon wurden pro Blatt 5,4 μ l eingesetzt.

2.6.2.2 Biolistischer Beschuß von Tabakblättern

Ca. 10 cm lange Blätter von auf RM-Medium gewachsenen sterilen Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum* cv. Petit Havana) wurden mit der abaxialen Seite zuoberst in Petrischalen mit RMOP-Medium gelegt und mit DNA-beschichteten Partikeln in einer heliumbetriebenen Partikelkanone (Sanford *et al.* 1991) beschossen. Dabei wurden pro Schuß 5,4 µl der Suspension mit den DNA-beschichteten Partikeln (siehe Kapitel 2.6.2.1) auf eine Membran („macrocarrier“) aufgetragen, in der Sterilbank getrocknet und in der Partikelkanone über einem Gitter („stopping screen“) angebracht. Die Heliumleitung wurde durch Einsetzen kleiner Membranblättchen („rupture disks“ 900 psi) abgeschirmt. Eine Petrischale mit einem Tabakblatt wurde in die dafür vorgesehene Halterung in der Kammer der Partikelkanone, ungefähr 10 cm unterhalb des Gitters, eingesetzt. Die Kammer wurde daraufhin verschlossen und evakuiert. Wenn das Vakuum ca. 25 Zoll Quecksilbersäule (das entspricht ca. 135 Torr oder 0,8 bar) erreichte, wurde der Schuß durch Öffnen des Ventils der Heliumleitung ausgelöst. Dabei platzt bei ca. 900 psi die „rupture disk“ und die partikelbeschichtete Membran wird durch die freigesetzte Druckwelle gegen das Gitter geschleudert. Die Partikel, die dabei durch die Maschen des Gitters geschleudert werden, gelangen mit großer Geschwindigkeit in die Zellen des darunterliegenden Tabakblattes. Sofort nach Platzen der „rupture disk“, erkennbar durch ein leises Knallgeräusch, wurde das Vakuum abgeschaltet, die Kammer der Partikelkanone wieder belüftet und das Blatt entnommen. Nach zwei Tagen Inkubation unter nichtselektiven Bedingungen wurden die Blätter in Stücke von ca. 5 mm × 5 mm geschnitten und auf RMOP-Medium mit Spectinomycin umgesetzt. Diese Blattstücke wurden, da sie durch Aufsaugen von Medium ihre Größe vervielfacht hatten, nach ca. zwei Wochen erneut klein geschnitten. Die Regeneration von Sprossen aus Einzelzellen wurde durch die synthetischen Phytohormone NAA (Strukturanalogon zu Auxin) und BAP (Cytokinin-Analogon) im RMOP-Medium induziert. Nach 5 bis 8 Wochen wuchsen erste potentielle Transformanten heraus.

Geschossen wurde mit dem PDS-1000/He Biolistic® Particle Deliver System (incl. Zubehör; Bio-Rad, München). Die Vakuumpumpe stammte von der Firma VacuuBrand GmbH & Co (Wertheim) und das Helium von Air Liquide GmbH (Berlin).

Für alle pflanzlichen Transformationsexperimente wurden sterile Pflanzen der Tabaklinie *Nicotiana tabacum* cv. Petit Havana verwendet. Sie wurden aus oberflächensterilisierten Samen (siehe Kapitel 2.6.2.5) kultiviert und/oder über Stecklinge auf RM-Medium in Gläsern vermehrt.

Bedingungen der Phytokammer, in der die Pflanzen kultiviert wurden:

Taglänge: 16 h
Temperatur: 24 °C (tags), 20 °C (nachts)
Beleuchtungsstärke: 7.000 – 10.000 lux
relative Luftfeuchtigkeit: 40 - 50 %

Experimente mit unterschiedlichen Temperaturen (siehe Abbildung 14):

Taglänge: 12 h
Temperatur: variierend
Beleuchtungsstärke: 7.000 – 10.000 lux
relative Luftfeuchtigkeit: 70 %

RM-Medium (für Gläser):
1,65 g $(\text{NH}_4)\text{NO}_3$
1,9 g KNO_3
0,44 g $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$
0,37 g $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$
0,17 g KH_2PO_4
40 mg FeEDTA
30 g Saccharose
1 ml 1000× Micro
mit H_2O auf 1 Liter aufgefüllt
pH 5,6 - 5,8 (mit 1 N KOH eingestellt)
100 ml pro Glas mit 0,75 g Agar (Purified)

nach Autoklavieren evtl. 1 ml Spectinomycin (50 mg/ml)

RMOP-Medium (für Platten):
1,65 g $(\text{NH}_4)\text{NO}_3$
1,9 g KNO_3
0,44 g $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$
0,37 g $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$
0,17 g KH_2PO_4
40 mg FeEDTA
100 mg myo-Inositol
30 g Saccharose
1 ml 1000× Micro
1 ml Thiamin (1 mg/ml)
100 µl NAA (1 mg/ml)
1 ml BAP (1 mg/ml)
7 g Agar (Purified)
mit H_2O auf 1 Liter aufgefüllt
pH 5,8 (mit 1 N KOH eingestellt)

für Spectinomycin-haltige Platten:
Zugabe von 10 ml Spectinomycin (50 mg/ml)

1000× Micro:	6,8 g $\text{MnSO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$
	3,1 g H_3BO_3
	4,3 g $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$
	415 mg KJ
	125 mg $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$
	12,5 mg $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$
	12,5 mg $\text{CoCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$
	mit H_2O auf 500 ml aufgefüllt

Die Medien basieren auf dem klassischen MS-Medium (Murashige & Skoog 1962).

2.6.2.3 Selektion transplastomischer Linien

Um tatsächliche Transformanden von Spontanmutanten zu unterscheiden, wurde nach Nukleinsäureisolierung (siehe Kapitel 2.1.1) mittels PCR (Kapitel 2.8) das eingesetzte Markergen mit spezifischen „Primern“ nachgewiesen.

In allen Experimenten wurde als Markergen ein chimäres *aadA*-Gen aus *E.coli* eingesetzt. Genprodukt von *aadA* ist Enzym Aminoglycosidadenylyltransferase, das Resistenz gegen die die prokaryotische Proteinsynthese hemmenden Antibiotika Spectinomycin und Streptomycin bewirkt. Dieses Gen wurde mit dem 3'-nichtcodierenden Bereich des plastidären *psbA*-Gens bzw. in einem anderen Fall des *rbcl*-Gens, einer synthetischen Shine-Dalgarno-Sequenz und dem Promotor des plastidären 16S-rRNA-Operons versehen (Svab & Maliga 1991, Koop *et al.* 1996). Es wurde in Transkriptionsrichtung des relevanten Gens in die Transformationsvektoren kloniert. Nicht alle Pflanzen, die auf dem selektiven Medium mit Spectinomycin wuchsen, besaßen auch das chimäre *aadA*-Gen. Spectinomycin-Resistenz kann auch durch spontane Punktmutationen in der 16S rRNA hervorgerufen werden (Svab & Maliga 1991). Erst nach PCR mit *aadA*-spezifischen „Primern“ konnten die tatsächlichen Transformanden identifiziert werden.

Da die mitochondrielle Proteinbiosynthese aus unbekanntem Gründen durch Spectinomycin nicht beeinträchtigt wird, stellt *aadA* einen plastidenspezifischen Marker dar. Resistenz der Plastiden genügt, um ein Überleben der Pflanzenzelle zu gewährleisten.

2.6.2.4 Regeneration homoplastomischer Linien

Wie in Kapitel 1.3 erwähnt sind Chloroplasten hochgradig polyploid. Bei der biologischen Transformation wird eine von vielen (bis zu 10.000 pro Zelle) Plastomkopien verändert. Durch wiederholte Regeneration kleiner Blattstücke auf selektivem (Spectinomycin-haltigem) Medium, wo erneut aus Einzelzellen Sprosse entstehen, was die Plastiden über das Proplastidenstadium mit weitaus weniger Plastomkopien (ein Nukleoid pro Plastide) führt, soll sich durch den Selektionsdruck nach und nach die *aadA*-haltige Version des Plastoms durchsetzen (Maliga 1993). Durch Restriktionsfragment-

2.7.2 Reverse Transkription

Die nach dem DNaseI-Verdau (siehe Kapitel 2.7.1) in 13,8 µl gelöste RNA wurde mit 1 µl „random primer“ (Hexanukleotide, Boehringer Mannheim) 5 min bei 60 °C denaturiert. Danach erfolgte die reverse Transkription mit:

4 µl 0,1 M DTT (GibcoBRL, Eggenstein)
8 µl 5× buffer (GibcoBRL, Eggenstein)
12 µl 2,5 mM dNTPs (Roth, Karlsruhe)
1 µl SuperScript™ RT (200 u/µl, GibcoBRL, Eggenstein)

für mindestens 2 h bei 37 °C.

Nach Abkühlen wurden die Proben mit 12 µl 2 N NaOH, 8 µl 50 mM EDTA pH 7,5 und 20 µl H₂O für 30 min bei 65 °C denaturiert und dann mit 96 µl 1 M Tris/HCl pH 7,5 und 440 µl 100 % Ethanol gefällt. Es wurde 30 min bei 12.000 × g und 4 °C zentrifugiert, das Sediment mit 70 % Ethanol gewaschen und in 50 µl H₂O gelöst. War nur ein schneller PCR-Nachweis notwendig, konnte auch direkt nach der reversen Transkription bei 80 °C denaturiert und 2 µl des gesamten Ansatzes direkt in die PCR (siehe Kapitel 2.8) eingesetzt werden.

2.8 Polymerasekettenreaktion (PCR)

(nach Mullis & Faloona 1987, Saiki *et al.* 1985 und 1988)

Mit Hilfe der PCR kann unter Verwendung spezifischer, antiparalleler Oligonukleotid-„Primer“ ein DNA-Bereich exponentiell amplifiziert werden. Dafür werden zyklische Temperaturveränderungen benötigt: Zuerst wird doppelsträngige DNA durch Hitze (93 - 94 °C Denaturierungstemperatur) denaturiert. Durch schnelles Abkühlen auf die „Annealing“-Temperatur, die je nach „Primer“-Sequenz (hoher G/C-Gehalt – höhere Temperatur möglich) unterschiedlich ist (ca. +/-5 °C der Schmelztemperatur T_m des „Primers“), wird die DNA in ihrer einzelsträngigen Form gehalten, damit eine Hybridisierung mit den einzelsträngigen „Primern“ erfolgen kann. An den „Primern“ startet dann die DNA-Polymerase in ihrem Temperaturoptimum (Polymerisierungstemperatur) die Synthese und verdoppelt das zwischen den „Primern“ liegende DNA-Stück. Dies wird 30 - 40 mal wiederholt. In jedem Zyklus wird dabei theoretisch die Menge des zu amplifizierenden Fragments verdoppelt, so daß man die Akkumulation des Amplifikats mit 2^n (n = Anzahl der Zyklen) angeben kann. Verwendet wurde eine hitzeresistente DNA-Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* (Taq-Polymerase, Temperaturoptimum 72 °C).

In einigen Fällen wurden mit an die „Primer“ angehängten Sequenzen erwünschte Veränderungen des „Templates“ geschaffen: die mit T7 bezeichneten „Primer“ (siehe Tabelle 2) haben die Sequenz des T7-Promotors angehängt, der dann die *in vitro*-Transkription des PCR-Produkts ermöglicht; anderen „Primern“ wurden Erkennungssequenzen von Restriktionsendonukleasen angeheftet, um Klonierungen zu erleichtern (Scharf *et al.* 1986, Kaufman & Evans 1990). Dabei ist zu beachten, daß die unterschiedlichen Restriktionsenzyme eine spezifische Mindestanzahl an Basen im Bereich der Erkennungssequenz benötigen, um schneiden zu können.

2.8.1 Durchführung

Standardreaktionsansatz:

5 µl 10× PCR-Puffer
5 µl 25 mM MgCl₂
5 µl dNTP-Mix (mit 2,5 mM pro Desoxyribonukleosidtriphosphat)
1 µl pro „Primer“ (10mM, je ein 5'- und ein 3'-„Primer“)
ca. 20 - 100 ng DNA
0,5 µl Taq-Polymerase
auf 50 µl aufgefüllt mit H₂O

10× PCR-Puffer:	264 mg (NH ₄)SO ₄
(10 ml)	7,5 ml 1 M Tris/HCl pH 9
	2,5 ml H ₂ O
	10 µl Tween20

Je nach Fragestellung wurden auch halbierte Ansätze verwendet.

Taq-Polymerase und -Puffer wurden selbst hergestellt oder von Qiagen (Hilden) bezogen. Im Qiagen-Puffer ist 15 mM MgCl₂ enthalten, weshalb hier im Standardansatz der Zusatz von MgCl₂ entfällt. Außerdem wurde für diese Ansätze nur 0,2 µl Taq-Polymerase (5 u/µl) verwendet.

Zusätzlich zu den Versuchsansätzen wurde jeweils eine Kontrollreaktion ohne DNA ausgeführt („Pufferkontrolle“), um mögliche Kontaminationen der Chemikalien auszuschließen. 10 µl eines jeden Ansatzes wurden auf einem Agarosegel analysiert (siehe Kapitel 2.10.1).

„Primer“	Markierung	Gen	Sequenz (5'→3')
M13rev	—	pBS	GGAAACAGCTATGACCATG
aadAli59	—	<i>aadA</i>	TGCTGGCCGTACATTTGTACG
aadAre60	—	<i>aadA</i>	CACTACATTTGCTCATCGCC
K6	—	<i>matK</i>	TTAGGGCATCCCATTAGTAAA
K7	—	<i>matK</i>	AAAAATATCCAAATACCAA
T7matK	—	<i>matK</i>	CGCGCGTAATACGACTCACTATAGGGCCAGATCATT GATACAAA
nb11	—	<i>ndhB</i>	TTCATGCTTGTTTGTAGTAATAGC
nb-P12	—	<i>ndhB</i>	GGTCTAATGAGGCTACTATG
RMndhI	—	<i>ndhI</i>	TAATTATAGTATTGATTTCCG
RMndhG	—	<i>ndhG</i>	TAGAATAAGGATATACAAACA
ngseq	IRD800	<i>ndhG</i>	AAGGATATACAAACAAGAAC
ng2	—	<i>ndhG</i>	CTGGGATTAGTTCTTGTTTG
petP1	—	<i>petB</i>	GCCTTTCTACTTTAAGCTCCAC
petP2	—	<i>petB</i>	AATACCACAACCTACCCG
T7petB	—	<i>petB</i>	CGCGCGTAATACGACTCACTATAGGGCAAAGAATAA CCAGTTAC
petBseq	IRD800	<i>petB</i>	TTACGTGGAGTGCTAGTGTG
petPseq	—	<i>petB</i>	CCAATCCACTTTGACTCG
psbAfor	—	<i>psbA</i>	GGAGCTGAATATGCAACAGCAATCC
psbArev	—	<i>psbA</i>	ATCCCTACCTTATTGACGGC
ClaPpsbDfor	—	<i>PpsbD</i>	TTCCAATCGATCTTGAACCTACCGAATATTC
BglXbaPpsD rev	—	<i>PpsbD</i>	TTCCAAGATCTTCTAGAGACAAATTCTTGTGGAATCC
rpl2rev	—	<i>rpl2</i>	CCATAGTGTATGAGACAAATG
rpl23-S	—	<i>rpl23</i>	ACCCGGGTTATTCTATTC
trnK+16S	—	<i>trnK</i>	CGAATCCCGGGCAACCCACTAGCAGCCGTCGTTCAA TGAGAATG
K1	—	<i>trnK</i>	TTGCCCGGGATTTCGAACCC
K2	—	<i>trnK</i>	ACTCAACGGTAGAGTACTC
ycf1-a	—	<i>ycf1</i>	GTGACATTTCCGTTCTTATG
ycf1-b	—	<i>ycf1</i>	AGTCTGGATACGGCAAATC
ycf1for-SacI	—	<i>ycf1</i>	TAAGTAGAGCTCGTTAGAATTGAGAAATCTATGG
ycf1rev-PstIa	—	<i>ycf1</i>	TCTCTATCTGCAGCTTTTCTTTCTTTTGTCTCC
ycf1rev-PstIb	—	<i>ycf1</i>	ATTTGACCTGCAGATTCGTTAATTATCTGATTACTC
Pycf1-XbaI	—	<i>ycf1</i>	TCATATTCTAGACCAGAAATTGCAATAGAAAAG
Pycf1-SacII	—	<i>Pycf1</i>	GAACTTCCGCGGTATAGAAAAGAAATAGAAAAGA
5S-SacII	—	5S	GGATGACCGCGGGCTTAACACCTCTCATTCTTA
ycf3-P9	—	<i>ycf3</i>	GTAATGACAGATCACGGCCAT
ycf3-P14	—	<i>ycf3</i>	GGATGTCGGCTCAATCCGAAG

Tabelle 2: Liste der verwendeten „Primer“

(Die verwendeten „Primer“ wurden von der Firma MWG-Biotech, Ebersberg synthetisiert.)

Verwendete PCR-Programme:

Standardprogramm: 3 min 94 °C
 30× 30 sec 94 °C
 30 sec 50 °C
 1 min 72 °C
 3 min 72 °C

Je nach Schmelztemperatur der eingesetzten „Primer“ wurde die „Annealing“-Temperatur erhöht oder gesenkt (siehe Text zu Beginn des Kapitels). Sollten längere Fragmente als 1,5 – 2 kB amplifiziert werden, wurde die Polymerisierungstemperatur auf bis zu 2,5 min verlängert. In schwierigen Fällen wurde ein Spezialprogramm für lange Amplifikate angewandt (ebenfalls mit je nach „Primer“ variierender „Annealing“-Temperatur), bei der die Polymerisierungstemperatur auf 65 °C gesenkt wurde, um die Reaktion der Taq-Polymerase zu verlangsamen. Dies sollte eine erhöhte Fehlerquote verhindern.

Spezialprogramm (lang): 5 min 94 °C
 30× 30 sec 94 °C
 45 sec 50 °C
 5 min 65 °C
 5 min 65 °C

Verwendete PCR-Geräte: Primus 96^{plus} (MWG-Biotech, Ebersberg)
 Cyclone 96 (peqlab, Erlangen)
 PCR Express (Hybaid, England)

2.8.2 Präparation von Taq-Polymerase

100 ml einer Kultur von Bakterien (in LB-Amp), die das Gen für die Taq-Polymerase in einem Expressionsvektor besitzen, wurden bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,2 – 0,3 kultiviert. Dann wurden 500 µl 1 M IPTG dazu gegeben und über Nacht (16 – 20 h) weiter kultiviert (Schüttler Modell Kühner, B. Braun, Melsungen). Nach 5 minütiger Zentrifugation bei 5000 × g wurde das Bakterien-sediment in 3 ml Puffer A resuspendiert und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 3 ml Puffer B wurde 1 h bei 75 °C im Schüttler inkubiert. Der Ansatz wurde daraufhin 10 min bei 12.000 × g zentrifugiert und der Überstand zuerst mit 1 Volumen SB mit 50 % Glycerin und dann mit 2 Volumen SB mit 75 % Glycerin gemischt. In dieser Form wurde das aufgereinigte Enzym bei –20 °C aufbewahrt und bei Bedarf aliquotiert.

Puffer A:	50 mM Tris/HCl pH 8 (150 μ l 1 M/3 ml) 50 mM Glucose (150 μ l 1 M/3 ml) 1 mM EDTA pH 8 (6 μ l 0,5 M/3 ml)
Puffer B:	10 mM Tris/HCl pH 8 (30 μ l 1 M/3 ml) 50 mM KCl (150 μ l 1 M/3 ml) 1 mM EDTA pH 8 (6 μ l 0,5 M/3 ml) 0,5 % Tween20 (15 μ l/3 ml) 0,5 % NP40 (15 μ l/3 ml)
Storage Buffer (SB):	50 mM Tris/HCl pH 8 100 mM NaCl 0,1 mM EDTA pH 8 0,5 mM DTT 1 % Triton X-100
SB & 50 % Glycerin:	300 μ l 1 M Tris/HCl pH 8/6 ml 120 μ l 5 M NaCl/6 ml 1,2 μ l 0,5 M EDTA pH 8/6 ml 30 μ l 0,1 M DTT/6 ml 60 μ l Triton X-100/6 ml 3 ml Glycerin/6 ml
SB & 75 % Glycerin:	600 μ l 1 M Tris/HCl pH 8/12 ml 240 μ l 5 M NaCl/12 ml 2,4 μ l 0,5 M EDTA pH 8/12 ml 60 μ l 0,1 M DTT/12 ml 120 μ l Triton X-100/12 ml 9 ml Glycerin/12 ml

2.9 Sequenzierung von DNA

(nach Sanger *et al.* 1977)

Um die Nukleotidsequenz eines DNA-Fragments zu bestimmen, wurde dieses mit spezifischen „Primern“ amplifiziert (analog der PCR-Reaktion, siehe Kapitel 2.8, nur mit je einem „Primer“ bzw. unterschiedlich markierten, siehe Kapitel 2.9.2) unter Zugabe von Didesoxynukleotiden, die einen Kettenabbruch bewirken, weil aufgrund der fehlenden Hydroxygruppe kein weiteres Nukleotid mehr angehängt werden kann. So entsteht eine Gruppe von Amplifikaten unterschiedlicher Länge, die jedes in der Sequenz vorkommende Nukleotid repräsentieren; jedes einzelne Amplifikat ist um das entsprechende Nukleotid länger als das vorhergehende (Sanger *et al.* 1977). Dabei wird mit vier Ansätzen gearbeitet, in die jeweils nur eine Sorte an Didesoxynukleotid gegeben wird. So gibt es je eine Spezies von Amplifikaten, die mit je einem in der Sequenz vorhandenen Nukleotid endet: ddATP, ddCTP, ddGTP und ddTTP mit unterschiedlich langen Produkten, die auf einem Polyacrylamidgel in vier separaten Spuren aufgetrennt werden. Diese Strategie wurde sowohl bei der radioaktiv markierten Sequenzierung als auch beim „energy-transfer fluorochrome dideoxynucleotide-labelling“ (Rosen-

blum *et al.* 1997) mit dem ABI 377 System (Applied Biosystems, USA) angewandt, wobei für jedes Nukleotid ein anderer Farbstoff Verwendung findet, alle vier Ansätze also in eine Spur geladen werden können (Kapitel 2.9.1). In einer anderen Technik wurden statt markierter Didesoxynukleotide Fluorochrom-markierte „Primer“ zu den entsprechenden vier Ansätzen gegeben und mit dem LI-COR 4200IR² Zwei Laser System (MWG Biotech, Ebersberg) detektiert (Kapitel 2.9.2).

Die Auftrennung erfolgte in dünnen Polyacrylamidgelen (Sanger & Coulson 1978), die Harnstoff enthielten, um eventuelle DNA-Sekundärstrukturen, die vor allem bei hohem G/C-Gehalt (>55 % auftreten, zu denaturieren (Deininger 1983).

2.9.1 Sequenzierung mit dem ABI PRISM 377 System

(ABI PRISMTM Big DyeTM Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, Applied Biosystems, USA)

30 - 90 ng der zu sequenzierenden DNA (PCR-Produkt) wurde mit 0,5 - 1 µl „Primer“ (100 ng) versetzt und mit H₂O auf 8 µl aufgefüllt. Nach Zugabe von 2 µl Big Dye erfolgte die Sequenzierungsreaktion mit dem Programm ABITC1.cyc auf dem Primus 96^{plus} Thermocycler (MWG-Biotech, Ebersberg). Danach wurde die DNA mit 90 µl H₂O, 10 µl 3 M Natriumacetat und 250 µl Ethanol (100 %) gefällt, 20 min bei 20 °C und 15.000 × g zentrifugiert und das luftgetrocknete Sediment in 4 µl Formamid/LBuffer (4:1) gelöst. Nach 3-minütigem Denaturieren bei 92 °C wurde die Probe auf Eis gehalten und 1 µl des Ansatzes auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen (Probenbehandlung nach Chen & Seeburg 1985, Hsiao 1991).

Sequenzgel (46 cm):
21 ml H₂O
18 g Harnstoff
7,1 ml 30 % Acrylamidlösung
6 ml 10× TBE

Nach Entgasung mittels Vakuumpumpe wurden 20 µl TEMED und 300 µl 10 % APS zur Polymerisation dazugegeben. Der Gellauf erfolgte bei 2.500 V, 45 °C für 11 h in 1× TBE für ABI.

Laufpuffer (10× TBE für ABI): 1,34 M Tris/HCl pH 8,8 (108 g/l)
0,44 M Borsäure (55 g/l)
19,7 mM EDTA (7,4 g/l)

Sequenzierprogramm:
(nach Ju *et al.* 1995)
2 min 95 °C
99× 10 sec 95 °C
5 sec 46 °C
4 min 60 °C

2.9.2 Sequenzierung mit dem LI-COR 4200IR² System

(Thermo Sequenase, Amersham-Pharmacia, Freiburg)

In eine Mikrotiterplatte (Biometra, Göttingen) wurde je 1,5 µl pro Basenmix (vom Hersteller zur Verfügung gestellt) vorgelegt. Außerdem wurden die zu sequenzierende DNA-Probe (ca. 50 ng für ein PCR-Produkt, ca. 250 ng für ein Plasmid), 1,5 µl markierter „Primer“ (10 ng bzw. 1,5 pmol/µl, Markierung RD800 oder 700) und 0,7 µl DMSO gemischt und mit H₂O auf 14 µl aufgefüllt. Davon wurden auf Eis je 3,5 µl zum jeweiligen Basenmix gegeben. Die Sequenzierungsreaktion erfolgte mit dem Programm Licor55.cyc auf dem Primus 96^{plus} Thermocycler (MWG-Biotech, Ebersberg). Unmittelbar danach wurden ca. 1,5 µl Stopplösung (vom Hersteller zur Verfügung gestellt) dazu gegeben. Vor dem Auftragen auf das Sequenzgel wurden die Proben 5 min bei 94 °C denaturiert. Aufgetragen wurden 1 – 1,5 µl.

(SequiTherm EXCELTM II Long-ReadTM DNA Sequencing Kit-LC, Epicentre Technologies, Biozym, Hessisch Oldendorf)

In eine Mikrotiterplatte (Biometra, Göttingen) wurden je 2 µl pro Basenmix (vom Hersteller zur Verfügung gestellt) vorgelegt. Außerdem wurden die DNA-Probe (ca. 50 ng für ein PCR-Produkt, ca. 250 ng für ein Plasmid), 2 µl markierter „Primer“ (10 ng/µl), 7,2 µl SequiTherm-Puffer und 1 µl SequiTherm DNA-Polymerase (5 u/µl) gemischt und mit H₂O auf 16 µl aufgefüllt. Davon wurde auf Eis je 4 µl zum jeweiligen Basenmix gegeben. Die Sequenzierungsreaktion erfolgte wie oben mit dem Programm Licor55.cyc auf dem Primus 96^{plus} Thermocycler (MWG-Biotech, Ebersberg). Vor dem Auftragen auf das Gel wurde mit dem Programm Seqdenat.cyc 5 min bei 95 °C denaturiert.

Sequenzgel (LI-COR):	21 g Harnstoff
(Rapid Gel XL 66 cm 4,6 %)	30,5 ml H ₂ O
	5 ml 10× TBE Long Run
	5,6 ml RapidGel TM -XL-40 % (USB TM , Amersham-Pharmacia, Freiburg)
	500 µl DMSO

Nach Sterilfiltration wurden 50 µl TEMED und 280 - 350 µl (je nach Raumtemperatur, bei höherer Temperatur weniger) 10 % APS zur Polymerisation dazugegeben. Der Gellauf erfolgte bei 45 °C und 2.200 V über Nacht in 1× TBE für LI-COR.

Laufpuffer (10× TBE für LI-COR):	4 M Tris/HCl pH 8,8 (324 g/l)
	0,44 M Borsäure (55 g/l)
	49,6 mM EDTA (18,6 g/l)

Sequenzierprogramm:	2 min 95 °C
	30× 15 sec 95 °C
	30 sec 50 °C
	1 min 72 °C
	5 min 72 °C

2.10 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

(nach Sambrook *et al.* 1989, Sambrook & Russell 2001)

Nukleinsäuren können aufgrund ihrer negativen Ladung im elektrischen Feld nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Der Kraft des elektrischen Feldes wirkt dabei die Reibung zwischen Molekül und Umgebung entgegen. Diese ist abhängig von Größe und Form des Moleküls und der Viskosität des Mediums. Damit ist die Geschwindigkeit eines Moleküls proportional zu Feldstärke und eigener Ladung und umgekehrt proportional zu Molekülgröße und Viskosität des Mediums. Unter konstanten Bedingungen wandern große Moleküle somit langsamer als kleine. Durch Ethidiumbromid, das in die Nukleinsäuren interkaliert, werden sie im UV-Licht ($\lambda = 254 \text{ nm}$) sichtbar (Sharp *et al.* 1973).

Photographiert wurde mit einer elektronischen Kamera (Mitsubishi P66DE, Mitsubishi Electric Corporation, Japan) und ausgedruckt auf Thermal Paper K61B-CE (Mitsubishi Electric Corporation, Japan). Für die Agarosegele wurde SeaKem®LE Agarose von Biozym Diagnostik GmbH (Hessisch Oldendorf).

Agarosekonzentration (%)	Molekülgröße (kB)
0.3	5-60
0.6	1-20
0.7	0,8-10
0.9	0,5-7
1.2	0,4-6
1.5	0,2-3
2.0	0,1-2

Tabelle 3: Optimale Agarosekonzentration zur Auftrennung von DNA

Die empfohlene Agarosekonzentration zur optimalen Auftrennung von DNA bestimmter Größenordnungen bezieht sich auf lineare DNA Moleküle (nach Sambrook & Russell 2001).

2.10.1 Gelelektrophorese von DNA

Verwendet wurden 1 - 2 %ige Agarosegele mit 1 μl /30 ml Ethidiumbromid (10 mg/ml).

Laufpuffer (10 \times TBE):
 1,34 M Tris/HCl pH 8,8 (108 g/l)
 0,44 M Borsäure (55 g/l)
 25 mM EDTA (9,3 g/l)
 (entspricht pH 8,3)

Ladepuffer:
 60 % Glycerin
 0,1 % Xylencyanol
 0,1 % Bromphenolblau
 in 1 \times Laufpuffer

Größenmarker:

λ -DNA (MBI-Fermentas, St. Leon-Rot) mit *EcoRI* und *HindIII* geschnitten mit Fragmenten von 21.226/5.148/4.973/4.268/3.530/2.027/1.904/1.584/1.375/947/831/564 Bp

2.10.2 Gelelektrophorese von RNA

2.10.2.1 RNA-Gele mit Formaldehyd

(nach Lehrach *et al.* 1977)

Einzelsträngige RNA kann Sekundärstrukturen ausbilden, die zu unberechenbaren Änderungen des Laufverhaltens im elektrischen Feld führen. Um dies zu verhindern wurde die RNA unter denaturierenden Bedingungen in 1 %igen Formaldehyd-Agarosegelen aufgetrennt.

Agarosegel (1 %): 1 (0,5) g Agarose
 74 (37) ml H₂O
 10 (5) ml 10× MOPS-Puffer
 nach Aufkochen, auf ca. 60 °C abkühlen lassen
 16 (8) ml Formaldehyd (37 %)

Laufpuffer: 100 (30) ml 10× MOPS-Puffer
 100 (30) ml Formaldehyd (37 %)
 800 (240) ml H₂O

Die Angaben gelten für ein mittleres (14 cm × 12 cm) bzw. ein kleines (8,5 cm × 7 cm) Gel (Angaben für das kleine Gel in Klammern).

10× MOPS-Puffer: 20 mM MOPS (42 g/l)
 5 mM Natriumacetat (6,8 g/l)
 1 mM EDTA (3,4 g/l)
 eingestellt auf pH 7 (mit NaOH)

Ladepuffer: 50 % Formamid (100 µl/200 µl)
 6,5 % Formaldehyd (35 µl 37 %/200 µl)
 1× MOPS-Puffer (20 µl 10×/200 µl)
 0,005 % Ethidiumbromid (1 µl 10 mg/ml /200 µl)

Die RNA-Proben wurden mit 2,5 Volumen Ladepuffer 5 - 10 min bei 60 °C denaturiert und auf Eis gestellt. Währenddessen wurde das Gel ca. 15 min bei 100 V vorelektrophoretisiert. Danach wurden die Proben mit 1/10 Volumen DNA-Ladepuffer versetzt.

Der Gellauf erfolgte bei 100 V (ca. 3½ h bei mittlerem, ca. 1½ h bei kleinem Gel).

Photographiert wurde mit einer elektronischen Kamera (Mitsubishi P66DE, Mitsubishi Electric Corporation, Japan) und ausgedruckt auf Thermal Paper K61B-CE (Mitsubishi Electric Corporation, Japan).

Größenmarker: RNA-Ladder 0,24 - 9,5 kb (GibcoBRL, Eggenstein)
 mit Fragmenten von 9,49/7,46/4,4/2,37/1,35/0,24 kB

2.10.2.2 RNA-Gele mit Glyoxal

(nach McMaster & Carmichael 1977)

Alternativ zu der unter 2.10.2.1 beschriebenen Methode, die durch den Zusatz von Formaldehyd nicht unerhebliche Gesundheitsrisiken birgt, kann die im Folgenden beschriebene Methode angewandt werden.

Die zu untersuchende RNA wurde in einem Volumen von 4 µl mit 4 µl deionisiertem 30 %igem Glyoxal, 9,5 µl DMSO (wurde eventuell in geringerer Menge eingesetzt, wenn ein größeres Volumen für die RNA benötigt wurde) und 2,5 µl 10× MOPS (siehe Kapitel 2.10.2.1) für 45 min bei 50 °C inkubiert, danach auf Eis abgekühlt und nach Zugabe von 5 µl Ladepuffer (wie für DNA-Proben, mit zusätzlich 80 - 95 % Formamid) auf ein Agarosegel (wie für DNA, aber mit MOPS-Puffer) geladen (siehe Kapitel 2.10.1). Der Gellauf erfolgte bei 4 °C, ansonsten wie in Kapitel 2.10.2.1.

Glyoxalvorbehandlung:

20 ml Glyoxal wurden mit 3 µl Ionenaustauscher (AG 501-X8 Bio-Rad Resin, München oder AmberLite® Ionenaustauschharz, Serva) 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann sterilfiltriert (32 mm Acrodisc® Syringe Filter 0,2 µm Supor® Membrane, PALL Gelman Sciences, Dreieich). 1 ml-Aliquots wurden bei -70 °C gelagert.

2.10.3 Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)

(nach Schwartz & Cantor 1984, Anand 1986)

Um extrem lange Nukleinsäurestücke in der Gelelektrophorese auftrennen zu können, wurde die Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) angewandt. In der hier verwendeten Methode sind mehrere Elektrodenpaare um das Gel verteilt (hexagonaler Aufbau), die abwechselnd für definierte Pulse Strom erzeugen, so daß die DNA immer wieder die Laufrichtung wechselt und sich praktisch Richtung Gelende schlängelt (Chu *et al.* 1986, Vollrath *et al.* 1987). Durch die so stark vergrößerte Laufstrecke können dann auch Fragmente von mehreren 1.000 kB voneinander getrennt werden.

2.10.3.1 Herstellung von cp-DNA-haltigen Blöckchen für die Pulsfeldgelelektrophorese

Eine Chloroplastensuspension (Chloroplastenisolierung siehe Kapitel 2.15) mit einer Konzentration von 5 – 8,5 mg/ml Chlorophyll (Bestimmung siehe Kapitel 2.16) wurde mit einer LMP-Agaroselösung (1 % Incert Agarose und 90 mM β-Mercaptoethanol in LMP) bei 42 °C (Agarose in flüssigem

Zustand) im Verhältnis 1:3 gemischt, in die Blöckchengießvorrichtung für die Pulsfeldgelelektrophorese gefüllt und bei 4 °C aufbewahrt, bis die Blöckchen fest geworden waren. Dann wurden die Blöckchen in Reaktionsgefäße überführt und mit 1,5 ml Lösung A (mit Detergenz) 15 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Lösung wurde daraufhin durch 1,5 ml RNaseA-haltige (20 mg/ml) Lösung A (mit Detergenz) ersetzt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Es folgte eine Inkubation mit Lösung A (ohne Detergenz) mit Proteinase K (0,2 mg/ml) für 24 h bei 50 °C. Mit Lösung B wurde abschließend zwei mal 4 h und dann über Nacht bei 50 °C inkubiert. In frischer Lösung B wurden die Blöckchen schließlich bei 4 °C gelagert.

LMP-Lösung:	125 mM Na-EDTA pH 8 330 mM Sorbit 25 mM Natriumcitrat/HCl pH 7
Lösung A:	450 mM Na-EDTA pH 8 10 mM Tris/HCl pH 8 wahlweise mit 1 % SLS als Detergenz
Lösung B:	500 mM EDTA pH 9

2.10.3.2 Durchführung der Pulsfeldgelelektrophorese

Ein einprozentiges Agarosegel wurde mit den halbierten Blöckchen aus Kapitel 2.10.3.1, die in 0,75 ml TMP 15 min bei Raumtemperatur geschüttelt wurden, beladen und mit 0,9 % Low Melting Point Agarose versiegelt. Die Elektrophorese erfolgte in einer speziellen Pulsfeldgelelektrophoresekammer (LKB Bromma 2015 Pulsaphor Electrophoresis Unit) in 1× TBE 24 h bei 170 V und 12 °C, wobei der Anfangspuls von 60 sec kontinuierlich auf 0,1 sec sank. Nach dem Lauf wurde das Gel 1 h bei 4 °C in 150 ml 1× TBE mit 7,5 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) eingefärbt. Photographiert wurde mit einer elektronischen Kamera (Mitsubishi P66DE, Mitsubishi Electric Corporation, Japan), auf Thermal Paper K61B-CE (Mitsubishi Electric Corporation, Japan) ausgedruckt. Das gewünschte DNA-Fragment (monomere Plastidenchromosomen) wurde aus dem Gel ausgeschnitten und eluiert (siehe Kapitel 2.11.3).

10× TBE (für Pulsfeldelektrophorese):	31,5 g Tris 16,1 g Borsäure 1,9 g Na-EDTA mit H ₂ O auf 260 ml aufgefüllt
Größenmarker:	λ DNA-PFGE von Amersham-Pharmacia, Freiburg (48,5 kb Concatemere)

2.11.3 DNA-Elution mit dem QIAEXII Agarose Gel Extraction Kit (nach Anleitung des Herstellers)

Nach der Pulsfeldelektrophorese (Kapitel 2.10.3) wurde die DNA aus Agarosegelen mit dem QIAEXII Agarose Gel Extraction Kit von Qiagen (Hilden) nach Anleitung des Herstellers isoliert. Nach Schmelzen der Agarose wurde hierbei die DNA durch hohe Salzkonzentration an Silicagelpartikel geheftet und nach Reinigung mit H₂O wieder gelöst. Dazu wurde das ausgeschnittene Gelstückchen mit 300 µl QX1-Puffer (für ca. 100 mg Gel) und 10 µl QIAEX II 10 min bei 50 °C geschmolzen, kurz abzentrifugiert und das Sediment einmal mit 500 µl QX1-Puffer und zweimal mit PE-Waschpuffer gespült und luftgetrocknet. Nach Lösen in 20 µl H₂O wurde nochmals mindestens 20 min bei 50 °C inkubiert und nochmals kurz zentrifugiert. Der klare Überstand enthielt die gereinigte DNA.

2.12 Transfer von Nukleinsäuren

Um elektrophoretisch aufgetrennte Nukleinsäurefragmente mit spezifischen radioaktiv markierten Sonden hybridisieren zu können, wurden sie aus den jeweiligen Elektrophoresegelen auf Membranen (Biodyne A Transfer Membrane 0,2 µm, PALL Gelman Sciences, Dreieich; Protran®Nitrocellulose Transfer Membrane, Schleicher & Schuell, Dassel; Nylon-Membran Hybond™-N, Amersham-Pharmacia, Freiburg) transferiert.

2.12.1 "Southern Blot"

(nach Southern 1975, Reed & Mann 1985)

Zum Denaturieren der DNA wurde das zu „blottende“ DNA-Gel vor dem Transfer 30 min mit Denaturierungslösung, zwei mal kurz mit Wasser und dann 40 min mit Neutralisierungslösung gewaschen. Danach wurde das Gel auf eine Pufferbrücke aus einem in 5× SSC eingetauchten Whatmanpapierstück (Whatman 3MM Chromatography Paper von Whatman, England) gelegt. Darauf wurde eine Membran, 2 Lagen Whatmanpapier und ca. 20 cm Filterpapierlagen geschichtet. Das Ganze wurde durch eine Glasplatte beschwert. Der Transfer erfolgte über Nacht. Die Fixierung der einzelsträngigen DNA auf der Membran erfolgte durch UV-Bestrahlung im UV-Stratalinker™ 1800 (Stratagene, Heidelberg) für 1 min bei 254 nm und 1200 µJoule ×100 und/oder durch „Backen“ bei 80°C.

Denaturierungslösung:	0,5 M NaOH (20 g/l) 1,5 M NaCl (87,6 g/l)
Neutralisierungslösung:	3 M NaCl (175 g/l) 0,5 M Tris/HCl pH 7 (60,5 g/l)
20× SSC:	3 M NaCl (175 g/l) 0,3 M Natriumcitrat (88 g/l)

2.12.2 „Northern Blot“

(nach Meinkoth & Wahl 1984)

Der Aufbau des „Blots“ und die Fixierung auf der Membran erfolgte wie beim „Southern Blot“. Da RNA einzelsträngig vorliegt und der Gellauf unter denaturierenden Bedingungen stattfand (siehe Kapitel 2.10.2), wurden RNA-Gele ohne vorheriges Denaturieren „geblottet“.

2.13 Herstellung radioaktiv markierter Sonden

2.13.1 Radioaktive Markierung einer DNA-Sonde

(mit dem DecaLabel™ DNA Labelling Kit, MBI Fermentas, Litauen, nach Anleitung des Herstellers, nach Feinberg & Vogelstein 1983 und 1984)

Ca. 35 - 50 ng DNA, z.B. ein PCR-Produkt, wurden mit 5 µl „random primer“ (in 5× Puffer) und deionisiertem H₂O auf 20 µl aufgefüllt und 5 - 10 min bei 100 °C inkubiert, danach auf Eis gehalten.

Nach Hinzufügen von 1,5 µl MixC (enthält dNTPs ohne dCTP) oder MixA (enthält dNTPs ohne dATP), 3 µl [α -³²P]-dCTP bzw. -dATP (10 µCi/µl, Amersham-Pharmacia, Freiburg) und 0,5 µl Klenow-Enzym (10 u/µl) wurde 5 - 15 min bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 2 µl dNTP-Mix wurde nochmals 5 - 15 min bei 37 °C inkubiert und schließlich die Reaktion mit 0,5 µl 0,5 M EDTA pH 8 gestoppt. Unmittelbar vor dem Hybridisieren von Membranen wurde die Sonde 3 - 5 min bei 95 °C denaturiert.

Verwendete DNA-Sonden: *aadA* (PCR-Produkt von der *aadA*-Kassette mit den „Primern“ *aadAre60/aadAli59*)
ycf1 (PCR-Produkt von Tabak-DNA mit den „Primern“ *ycf1-a/ycf1-b*)
psbA (PCR-Produkt von Tabak-DNA mit den „Primern“ *psbAfor/psbArev*)

2.13.2 Radioaktive Markierung einer RNA-Sonde

(nach Melton *et al.* 1984)

Radioaktive RNA-Sonden wurden hergestellt, indem ein spezifisches DNA-Stück unter Zugabe eines radioaktiven Ribonukleosidtriphosphats (hier UTP) transkribiert wurde: 2 µl 10× Puffer (NEB) wurden mit 2 µl 0,1 M DTT, 4 µl rNTP-Mix (mit 2,5 mM pro Ribonukleosidtriphosphat, aber ohne UTP) versetzt. Darauf wurden 5 µl [α - 32 P]-UTP (10 µCi/µl, Amersham-Pharmacia, Freiburg), 0,2 bis 1 µg des zu transkribierenden DNA-Stücks, das einen T7-Promotor enthalten muß (z.B. durch PCR-„Primer“, der die entsprechende Promotorsequenz angehängt hatte, hinzugefügt) mit 0,5 µl T7-RNA-Polymerase (50 u/µl, NEB) dazu gegeben und 30 min bis 1 h bei 37 °C inkubiert. Je nach Verwendung wurde danach noch einmal mit 1 µl DNaseI (10 u/µl, Boehringer, Mannheim) 15 min bei 37 °C inkubiert.

Verwendete RNA-Sonden: *petB* (PCR-Produkt von Mais-cDNA mit den „Primern“ petP1/
ADT7petB)
matK (PCR-Produkt von Tabak-DNA mit den „Primern“ K6/T7matK)

2.14 Hybridisierung von Nukleinsäuren mit radioaktiv markierten Sonden

(nach Meinkoth & Wahl 1984)

Um unspezifische Bindungen im Hintergrund zu verhindern, wurde die Transfermembran nach dem „Southern“ oder „Northern Blot“ (siehe Kapitel 2.12) mehrere Stunden bei 65 °C mit dem Hybridisierungspuffer „Manhattan“ prähybridisiert. Die im Hybridisierungspuffer enthaltene denaturierte Heringssperma-DNA bindet die transferierten Nukleinsäuren schwach und unspezifisch, so daß die spezifische Sonde nur dort eine Bindungschance bekommt und die Heringssperma-DNA verdrängen kann, wo sie wirklich paßt.

Nach der Prähybridisierung wurde die denaturierte (3 – 5 min, 95 °C) radioaktiv markierte Sonde (siehe Kapitel 2.13) zugegeben und über Nacht unter Drehen bei 60 bis 65 °C inkubiert (Hybridisierungsöfen der Firma Bachofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen). Daraufhin wurde die Membran mit 2× SSC, 0,1 % SDS, mit 1× SSC, 0,1 % SDS und eventuell noch mit 0,5× SSC, 0,1 % SDS (zunehmende Stringenz) bei 65 °C gewaschen, bis die Membran nur noch schwach radioaktive Zonen aufwies bzw. im Waschpuffer keine Radioaktivität mehr nachzuweisen war. Die gewaschene Membran wurde in Frischhaltefolie eingepackt und je nach Stärke des Signals 30 min bis mehrere Tage in einer lichtundurchlässigen Röntgenkassette mit einem Phosphor-Imaging-Screen belegt. Die Signale auf der „Imaging Plate“ wurden im BAS 1500 (Fujifilm, Japan) eingelesen und mit dem Programm TINA 2.0 ausgewertet.

Sollte die Membran erneut mit einer anderen Sonde hybridisiert werden, wurde die vorherige Sonde mit 1 % kochendem SDS und 30 minütiger Inkubation bei 85 °C abgelöst.

Hybridisierungslösung „Manhattan“:

- 5× SSC (250 ml 20×/l)
- 0,5 % SDS (25 ml 20 %/l)
- 10 mM Tris/HCl pH 7,4 (10 ml 1 M/l)
- 20 mM Natriumphosphatpuffer pH 6,5 (20 ml 1 M/l)
- 2 mM EDTA pH 7,4 (4 ml 0,5 M/l)

Pro 200 ml Lösung wurden vor Verwendung 4 ml denaturierte (10 min, 100 °C) 1 % Heringssperma-DNA frisch dazu gegeben.

20× SSC:

- 3 M NaCl (175 g/l)
- 0,3 M Natriumcitrat (88 g/l)

2.15 Isolierung von Chloroplasten

(nach Robinson & Barnett 1988)

Um aus Pflanzenblattmaterial intakte Chloroplasten zu isolieren, ist eine vorsichtige, schonende Handhabung und stetige Kühlung wichtig. Außerdem sind Medien notwendig, die das Milieu innerhalb der Pflanzenzelle simulieren. Um dies zu erreichen, werden ein Osmotikum (hier Sorbit), ein Puffersystem (hier Isoascorbatpuffer) und bestimmte Ionen benötigt. Beim Aufschluß der Pflanzenzelle werden oft viele Salze aus der Vakuole freigesetzt, weswegen die Zugabe eines Komplexbildners (hier EDTA) erforderlich sein kann. Schutz vor Oxidationen bietet hier zusätzlich das Isoascorbat. Um einen gewissen Abbau von Stärke zu erreichen, wurden Gewächshauspflanzen mindestens einen Tag dunkel adaptiert.

Durchführung:

Blätter wurden in Stücke geschnitten und mit ca. 250 ml 1× Homogenisationspuffer im Mixer (Waring® Commercial Blendor, USA) homogenisiert. Das Homogenat wurde durch Miracloth (Calbiochem, USA) filtriert und in einer Beckman Avanti™ J-25-Zentrifuge (Unterschleissheim-Lohhof) bei 4 °C kurz auf 4.000 × g beschleunigt. Das Sediment wurde vorsichtig in ca. 1 ml 1× Homogenisationspuffer resuspendiert und die Suspension dann auf einen Percollgradienten gegeben und 10 min bei 4 °C und 6.000 × g zentrifugiert. Im Gradienten zeigten sich zwei grüne Fragmente (intakte Chloroplasten auf der 80 %-Stufe, aufgebrochene im oberen Drittel), die vorsichtig abgenommen, mit je 2 Volumen 1× Homogenisationspuffer gemischt und 30 sec bei 4.000 × g zentrifugiert wurden. Die Chloroplasten wurden entweder eingefroren (für einfache Tests, DNA- und Proteinisolierung, wo kein Wert auf die Intaktheit gelegt wurde) oder frisch (intakte Chloroplasten) in die Blöckchenherstellung für die Pulsfeldgelelektrophorese (siehe Kapitel 2.10.3.1) eingesetzt.

5× Homogenisationspuffer (pH 6,8):	1,65 M Sorbit (90 g/300 ml) 5 mM Natriumpyrophosphat (12 ml 125 mM/300 ml) 250 mM HEPES (75 ml 1 M/300 ml) 10 mM EDTA pH 8 (6 ml 0,5 M/300 ml) 5 mM MgCl ₂ (1,5 ml 1M/300 ml) 5 mM β-Mercaptoethanol (105 µl/300 ml)
Isoascorbatpuffer (pH 7):	500 mM Isoascorbat (1,5 g/15 ml) 50 mM HEPES (750 µl 1 M/15 ml) (ca. 5 Tropfen 1 M NaOH)
1× Homogenisationspuffer:	100 ml 5× Homogenisationspuffer 5 ml Isoascorbatpuffer auf 500 ml mit H ₂ O aufgefüllt

Percollgradienten:

	<u>40 %ige Lösung</u>	<u>80 %ige Lösung</u>
Percoll	8 ml	8 ml
5x Homogenisationspuffer	4 ml	2 ml
PEG 6000	2 g	1 g
Isoascorbatpuffer	0,2 ml	0,1 ml
H ₂ O	auf 20 ml aufgefüllt	---

Pro 30 ml-Zentrifugenröhrchen (Corex®, Sigma-Aldrich, Steinheim) wurde 16 ml 40 %ige Percoll-Lösung mit 9 ml 80 %iger Percoll-Lösung unterschichtet.

Das Verfahren wurde bei limitierenden Blattmaterialmengen auch in kleinerem Maßstab (1/10) ausgeführt (siehe Kapitel 3.1.2). Dabei wurden 100 µl einer Chloroplastensuspension auf einen Percollgradienten gegeben, der in einem 2 ml-Reaktionsgefäß aus 0,6 ml 80 % und 1,2 ml 30 % Percoll-Lösung hergestellt worden war.

2.16 Isolierung von Proteinen

(nach Meurer *et al.* 1996)

Blattstücke wurden in flüssigem Stickstoff fein zermörsert und unter Rühren in ein Gefäß mit ca. 3 ml (je nach Blattmenge) Homogenisationspuffer gegeben und 10 min auf Eis inkubiert. Das Homogenat wurde durch Miracloth (Calbiochem, USA) filtriert und 10 min bei 10.000 × g zentrifugiert. Der Überstand enthielt die lösliche Proteinfraction, das Membransediment wurde in Carbonatpuffer resuspendiert. Für den Einsatz in der SDS-Gelelektrophorese wurden diese Proben mit Inkubationspuffer versetzt.

Homogenisationspuffer:	10 mM EDTA (20 μ l 0,5 M/ml) 2 mM EGTA (4 μ l 0,5 M/ml) 50 mM Tris/HCl pH 8 (50 μ l 1 M/ml) 10 mM DTE (10 μ l 1 M/ml)
Carbonatpuffer:	100 mM Na ₂ CO ₃ 10 % Saccharose 50 mM DTE

Konzentrationsbestimmung von Proteinen für die Gelelektrophorese:

1. Auf ein Whatmanpapierstück (Whatman 3MM Chromatography Paper von Whatman, England) wurden Tropfen verschiedenen Volumens (meist 1, 2 und 5 μ l) der Proteinproben pipettiert und beschriftet. Dann wurde das Whatmanpapier kurz mit Coomassie (siehe Kapitel 2.18.1) angefärbt und mit Wasser abgespült, bis nur noch die Proteintropfen angefärbt waren. Anhand der unterschiedlich starken Färbung konnten die Proteinkonzentrationen der einzelnen Tropfen einander angeglichen und entsprechend in die PAGE eingesetzt werden (Kapitel 2.17).
2. Bestimmung nach Bradford (1976): verschiedene Volumina der Proteinproben (z.B. 1 μ l, 5 μ l, eventuell aus Verdünnungen) wurden in je 1 ml Bradford-Reagenz pipettiert, gemischt und kurz bei Raumtemperatur inkubiert. Bei der Bindung von Coomassie Brilliant Blue G-250 an Proteine verschiebt sich dessen Absorptionsmaximum von 465 auf 595 nm. Diese Verschiebung der Absorption korreliert mit der gebundenen Proteinmenge. Die OD₅₉₅ der Proben wurde mit den Werten einer Eichkurve, die mit definierten Mengen an BSA erstellt worden war, verglichen.

Bradford-Reagenz:	Coomassie Brilliant Blue G 250 (100 mg/l) 100 % Ethanol (50 ml/l) 85 % Phosphorsäure (100 ml/l)
-------------------	---

3. Chlorophyllbestimmung nach Arnon (1949): verschiedene Volumina der Proteinproben (z.B. 1 μ l, 5 μ l, eventuell aus Verdünnungen) wurden mit je 1 ml 80 % Aceton gemischt und 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Ausgefällene Proteine wurden abzentrifugiert und danach wurde die optische Dichte des Überstandes bei zwei verschiedenen Wellenlängen bestimmt (663 und 645 nm) und mit folgender Formel die Chlorophyllkonzentration errechnet: $(OD_{663} \times 8,02) + (OD_{645} \times 20,2) = \text{mg Chl/l}$. Bei Wildtyppflanzen mit intakten Photosynthesekomplexen kann man davon ausgehen, daß 1 μ g Chlorophyll ungefähr 10 μ g Gesamtprotein entsprechen.

Sollten Proteine aus isolierten Chloroplasten (siehe Kapitel 2.15) elektrophoretisch aufgetrennt werden, so wurden die Chloroplasten mit 50 mM HEPES osmotisch geschockt (10 min bei Raumtemperatur). Nach einer Zentrifugation von 10 min bei $15.000 \times g$ konnten die Stromaproteine im Überstand und die Thylakoidmembranen als Sediment, das in Carbonatpuffer gelöst wurde, getrennt werden.

2.17 Gelelektrophorese von Proteinen

(nach Westermeier *et al.* 1989, Rehm 2000)

Mit der Gelelektrophorese von Proteinen wurde in den 60er Jahren begonnen (Ornstein 1964, Davis 1964, Shapiro *et al.* 1967), bis sie 1970 mit der Entwicklung SDS-haltiger Polyacrylamidgele, die auch heute noch fast unverändert angewandt werden, vervollkommen wurde (Laemmli 1970, Kapitel 2.17.1). Dabei handelt es sich um ein diskontinuierliches Puffersystem: Ein pH-Wertsprung zwischen Sammel- (pH 6,8) und Trenngel (pH 8,8) bewirkt, daß die Proteine an der Grenze zwischen Trenn- und Sammelgel zurückgehalten werden, so daß sie sich vor der eigentlichen Auftrennung in einer Front sammeln. Zusätzlich ist die Polyacrylamidkonzentration im Sammelgel so niedrig, daß die größeren Proteine zunächst nicht zurückgehalten werden. Das im Laufpuffer enthaltene hydrophile Glycin (als Folgeion) ist bei pH 6,8 im Sammelgel ungeladen (und nicht mit SDS beladen), so daß bei Anlegen des Stroms zunächst die Cl⁻-Ionen im Gel und die durch SDS-Beladung negativ geladenen Proteine in Richtung Anode wandern. An der Grenze zum Trenngel werden die Proteine von den Glycinionen überholt, der pH-Wert steigt auf ca. 9,5, damit erhalten die Proteine eine höhere Nettoladung und der Gellauf wird beschleunigt. Der Einsatz von SDS bewirkt zum einen eine Überdeckung der individuellen Ladung eines Proteins, so daß der Molekularsiebeffekt der porösen Polyacrylamidgelschicht die SDS-Proteinkomplexe nach ihrem Stokes-Radius und damit nach ihrem Molekulargewicht auftrennt. Zum anderen werden durch SDS-Behandlung Wasserstoffbrücken gespalten, hydrophobe Wechselwirkungen aufgehoben, Aggregatbildungen von Proteinen verhindert und Sekundärstrukturen aufgehoben, wobei erst die Zugabe von β -Mercaptoethanol oder DDT eine vollständige Streckung der Polypeptide bewirkt. Unter konstanten Bedingungen wandern so große Moleküle langsamer als kleine.

Je nachdem, ob man die größeren oder die kleineren Proteine besser auftrennen möchte, wählt man ein niedrig- bzw. höherprozentiges Polyacrylamidgel und variiert dadurch die Porengröße. Bei sehr kleinen Proteinen wird die Auflösung jedoch ungenügend. Aus diesem Grund haben Schagger und von Jagow ein spezielles Gel- und Puffersystem für kleine Peptide entwickelt (Schagger & von Jagow 1987, Kapitel 2.17.2).

Die Elektrophoresen erfolgten in einer selbstgebauten Flachgelapparatur nach Studier (1973).

2.17.1 Analytische SDS-PAGE nach Laemmli

(nach Laemmli 1970)

Je nach Größe der zu untersuchenden Proteine wurde die Polyacrylamidkonzentration der Gele so ausgewählt, daß in diesem Bereich die deutlichste Auftrennung zu erreichen war:

Masse der untersuchten Proteine	geeignete Polyacrylamidkonzentration
bis 14 kDa	Gradient von 12 bis 22 % PAA
20 – 35 kDa	18 % PAA
30 – 40 kDa	15 % PAA
60 – 100 kDa	12 % PAA
> 100 kDa	7,5 % PAA
> 200 kDa	Gradient 5 – 15 % PAA

Tabelle 4: Optimale PAA-Konzentrationen zur Auftrennung von Proteinextrakten

Empfohlene PAA-Konzentrationen für unterschiedliche Proteingrößen (nach The Recombinant Protein Handbook 2000).

Standardprotokoll:

Trenngel:	x % Polyacrylamid (30:0,8 %) 375 mM Tris/HCl pH 8,8 (3 M) 0,1 % SDS (10 %) 30 µl TEMED/30ml 90 µl 10 % APS/30ml
Polyacrylamid (30:0,8 %):	292 g 2× Acrylamid/l 8 g 2× N,N'-Methylenbisacrylamid/l
Sammelgel:	x % Polyacrylamid (30:0,8 %) 125 mM Tris/HCl pH 6,8 0,1 % SDS (10 %) 50 µl TEMED/30 ml 150 µl 10% APS/30 ml
Acrylamidlösung:	120 g Acrylamid 3,75 g N,N'-Methylenbisacrylamid auf 250 ml mit H ₂ O aufgefüllt

Protokoll für Gradientengele:

	12 %	bzw. 5 %	22 %	bzw. 15 %
Polyacrylamid (30:0,8 %)	12 ml	bzw. 5 ml	22 ml	bzw. 15 ml
3 M Tris/HCl pH 8,8	3,75 ml		3,75 ml	
10 % LDS	300 µl		300 µl	
70 % Saccharose	1 ml		3 ml	
H ₂ O	12,95 ml		0,95 ml	

Sammelgel:	2 ml Polyacrylamid 6,5 ml Gelpuffer auf 25 ml mit H ₂ O aufgefüllt 20 µl TEMED 200 µl 10 % APS
Gelpuffer:	3 M Tris/HCl pH 8,5 0,3 % SDS
Acrylamidlösung:	120 g Acrylamid 3,75 g Bis-Acrylamid auf 250 ml mit H ₂ O aufgefüllt
5× Kathodenpuffer:	0,5 M Tris 0,5 M Tricin pH 8,25 0,5 % SDS
5× Anodenpuffer:	1 M Tris/HCl pH 8,9

Probenbehandlung und Inkubationspuffer erfolgte wie bei der Laemmli-PAGE (siehe Kapitel 2.17.1).

Elektrophorese für 20 cm × 20 cm × 1,5mm Gele (Standardgelgröße):

Gestartet wurde mit 80 V, bis die Proben ins Gel eingelaufen waren, dann erfolgte die Elektrophorese bei konstant 50 mA für 20 h bei Raumtemperatur.

2.18 Anfärbung von Proteinen

2.18.1 Proteinfärbung mit Coomassie

(nach Piccioni *et al.* 1982)

Bei größeren Proteinmengen ist das Anfärben von Proteinen mit Coomassie ausreichend. Die Gele (siehe Kapitel 2.17) wurden mit 20 % Trichloressigsäure 1 h bei Raumtemperatur fixiert und danach mit Wasser gewaschen. Die Färbung erfolgte daraufhin mit:

0,1 % Coomassie Blue R 250 (Serva, 1 %ige Lösung in Methanol)
30 % Methanol
12 % Essigsäure

1 bis 2 h bei 50 °C oder über Nacht bei Raumtemperatur.

Entfärbt wurde mit 12 % Essigsäure, die immer wieder gewechselt wurde, bis nur noch die Proteinfragmente blau gefärbt waren und der Hintergrund kein Coomassie mehr enthielt.

2.18.2 Silberfärbung von Proteinen

(nach Blum *et al.* 1987)

Bei geringeren Proteinkonzentrationen wurde zusätzlich eine Silberfärbung vorgenommen, da diese um ein Vielfaches empfindlicher ist (bis ca. 5 ng Protein/Fragment) als die Färbung mit Coomassie (bis ca. 1 µg Protein/Fragment, Kapitel 2.18.1). Vorfärbung mit Coomassie soll die Silberfärbung noch verstärken (De Moreno *et al.* 1985). Der Nachteil der Silberfärbung ist die mangelnde Quantifizierbarkeit und schwierige Reproduzierbarkeit. Außerdem werden auch Nukleinsäuren, Lipopolysaccharide, Lipide und Glykolipide mit gefärbt.

Die Gele wurden 1 h bei Raumtemperatur fixiert mit:

50 % Ethanol
12 % Essigsäure
0,05 % Formaldehyd (1,35 ml 37 %/l)

und anschließend 3 mal 30 min mit 50 % Ethanol gewaschen.

Vor der Färbung wurde 1,5 min mit 0,02 % Natriumthiosulfat vorbehandelt und 3 mal 30 sec mit Wasser gewaschen.

Es folgte die Imprägnierung für 30 min mit 0,2 % Silbernitrat und 0,075 % Formaldehyd im Dunkeln, woraufhin 2 mal mit Wasser gewaschen wurde.

Die Entwicklung der Silberfärbung erfolgte mit

6% Natriumcarbonat (6 g/100 ml)
0,05% Formaldehyd (135 µl 37 %/100 ml)
0,0004% Natriumthiosulfat (4 µl 10 %/100 ml)

und wurde mit 50 % Ethanol und 12 % Essigsäure gestoppt, sobald die Proteinfragmente sichtbar wurden.

(Die angegebenen Zeiten gelten für 1,5 mm dicke Gele.)

2.19 Transfer von Proteinen („Western Blot“)

(nach Towbin *et al.* 1979, Sambrook *et al.* 1989, Sambrook & Russell 2001)

Um elektrophoretisch aufgetrennte Proteine mit spezifischen Antiseren hybridisieren zu können, wurden sie aus Gelen auf Membranen (BiotraceTM NT 0,45 µm, PALL Gelman Sciences, Dreieich; PVDF Transfer Membrane 0,45 µm und Hybond-P, Amersham-Pharmacia, Freiburg) transferiert. Dazu wurde das zu „blottende“ Gel (im Falle von Schagger und von Jagow von Kathodenpuffer benetzt) auf die Kathodeneinheit der Transfer-Apparatur (Owl Separation Systems, peqlab, Erlangen) auf drei mit Kathodenpuffer befeuchtete, auf Gelgröße zurecht geschnittene Whatmanpapierstücke (Whatman 3MM Chromatography Paper von Whatman, England) gelegt. Dies wurde mit der entsprechenden Transfermembran belegt; Nitrocellulosemembranen wurden in 10 % Methanol und

PVDF-Membranen in 100 % Methanol vorbehandelt und nach zweimaligem Waschen in Wasser mit Anodenpuffer II befeuchtet. Darauf wurden zwei mit Anodenpuffer II befeuchtete und drei mit Anodenpuffer I befeuchtete Whatmanpapierstücke (in Gelgröße) geschichtet, eventuelle Luftblasen entfernt und die Anodeneinheit im Deckel des Gerätes aufgesetzt. Der Transfer erfolgte für zwei Stunden mit konstantem Strom, dessen Stärke von der Größe des Gels abhängig war und mit folgender Formel errechnet wurde: Länge \times Breite \times 0,8 = Stromstärke in mA.

Kathodenpuffer: 40 mM ϵ -Aminocapronsäure
0,01 % SDS

Anodenpuffer II: 25 mM Tris

Anodenpuffer I: 0,3 M Tris

2.20 Hybridisierung von Proteinen mit Antiseren

2.20.1 Immunodetektion mit alkalischer Phosphatase

(nach Blake *et al.* 1984)

Nach dem Transfer von Proteinen auf eine Membran (siehe Kapitel 2.19) wurde diese für 30 – 60 min bei Raumtemperatur in 1 \times PBS-T mit Trockenmilch (Magermilchpulver von Saliter, Obergünzburg) blockiert. Danach wurde mit dem aus Kaninchenblut gewonnenen spezifischen 1. Antiserum (definiert verdünnt in 1 \times PBS-T mit Trockenmilch) 1 - 2 h inkubiert. Nicht gebundene Antikörper wurden viermal für je 5 bis 10 min mit 1 \times PBS-T mit Trockenmilch abgewaschen, bevor der mit alkalischer Phosphatase gekoppelte 2. Antikörper (anti-Kaninchenantikörper, in 1 \times PBS-T mit Trockenmilch, Verdünnung 1:20.000) 1 bis 2 h inkubiert wurde. Nach zweimaligem Waschen mit 1 \times PBS-T wurde zweimal mit Äquilibrierungslösung gespült, bevor mit 1,5 mg BCIP und 3 mg NBT in Äquilibrierungslösung entwickelt wurde. Die spezifisch gebundenen Fragmente zeigen eine lichtempfindliche Farbreaktion, weswegen die entwickelten „Blots“ in Aluminiumfolie aufbewahrt wurden.

10 \times PBS: 750 mM NaCl (43,38 g/l)
30 mM KCl (2,23 g/l)
45 mM Na₂HPO₄ (6,39 g/l)
15 mM KH₂PO₄ (2,04 g/l)

1 \times PBS-T: 1 \times PBS
1 % Tween20
eventuell mit 5 % Trockenmilch
(Magermilchpulver von Saliter, Obergünzburg)

Äquilibrierungslösung: 0,1 M Diethanolamin pH 9,6 (10 ml 1 M/100 ml)
1 mM MgCl₂ (100 μ l 1 M/100 ml)

2.20.2 Immunodetektion mit ECL™ (Enhanced Chemoluminescence) (Amersham-Pharmacia, Freiburg, nach Ogata *et al.* 1983)

Nach dem Transfer von Proteinen auf eine Membran (siehe Kapitel 2.19) wurde diese für 30 – 60 min bei Raumtemperatur oder bei 4 °C über Nacht in 1× TBS-T mit Trockenmilch (Magermilchpulver von Saliter, Obergünzburg) blockiert, zweimal für 10 min mit 1× TBS-T gewaschen, bevor das spezifische aus Kaninchenblut gewonnene 1. Antiserum (in 1× TBS-T) zugegeben und 1 h bei 25 °C inkubiert wurde. Nicht gebundene Antikörper wurden vier mal je 5 – 10 min mit 1× TBS-T abgewaschen, bevor mit dem 2. Antikörper (anti-Kaninchenantikörper, Peroxidasekonjugat, in 1× TBS-T) 1 h bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Nach weiteren vier Waschschritten mit 1× TBS-T wurde in der Dunkelkammer entwickelt. Dabei wurden die Entwicklungslösungen 1 und 2 im Verhältnis 1:1 miteinander vermischt und auf die Membran gegeben. Nach einer Minute wurden leuchtende Fragmente sichtbar, die auf einem aufgelegten Röntgenfilm (Hyperfilm™ MP, Amersham Pharmacia, Freiburg) festgehalten wurden. Bei stark leuchtenden Fragmenten war dabei bis zu einer Minute Auflegen ausreichend, bei schwächer leuchtenden Fragmenten wurde bis zu 30 min exponiert; das entspricht der Halbwertszeit der Chemolumineszenz.

Die ECL-Methode hat den Vorteil, daß sie etwa zehn mal sensitiver als die Entwicklung mit alkalischer Phosphatase (siehe Kapitel 2.20.1) und quantifizierbar ist. Der Nachteil ist jedoch die kurze Halbwertszeit des Enzyms und der zunehmende Hintergrund unspezifischer Bindungen nach längerer Exposition.

10× TBS:	200 mM Tris/HCl pH 7,6 (48,46 g/2 l) 1,37 M NaCl (160 g/2 l)
1× TBS-T:	1× TBS 0,1 – 1 % Tween20 (15 ml/2 l) zum Blockieren 5 % Trockenmilch (Magermilchpulver von Saliter, Obergünzburg)
Entwicklungslösung 1:	100 mM Tris/HCl pH 8,5 (5 ml 1 M/50 ml) 2,5 mM Luminol (500 µl 250 mM/50 ml) 0,4 mM p-Cumarsäure (220 µl 90 mM/50 ml)
Entwicklungslösung 2:	100 mM Tris/HCl pH 8,5 (5 ml 1 M/50 ml) 0,0183 % H ₂ O ₂ (30,5 µl 30 %/50 ml)

2.21 Überexpression von Proteinen in *E.coli*

(nach Sambrook *et al.* 1989, Qiagen-Protokoll „The QIAexpressionist“ 03/97, Sambrook & Russell 2001)

Das zu überexprimierende Gen wurde in einen geeigneten Vektor mit Start- und Stoppkodons kloniert (siehe Kapitel 2.5) und durch Sequenzierung (siehe Kapitel 2.9) auf Erhalt des korrekten Leserasters überprüft. Dieser Vektor wurde in einen geeigneten Bakterienstamm transformiert (siehe Kapitel 2.6.1.2). Im Falle von pQE-Vektoren (Qiagen, Hilden) konnte die Expression des inserierten Gens direkt mittels „Kolonieblot“ überprüft werden (Kapitel 2.21.1).

2.21.1 Transfer zur Überprüfung von Bakterienkolonien („Kolonieblot“)

(nach Qiagen-Protokoll „The QIAexpressionist“ 03/97)

Um nach der Bakterientransformation (siehe Kapitel 2.6.1.3) von Überexpressionsvektoren zu überprüfen, ob eine gewachsene Bakterienkolonie nicht nur das zu exprimierende Gen in seinem Vektor enthielt, sondern dieses Gen auch exprimierte, wurden im Falle von pQE-Vektoren (Qiagen, Hilden) „Kolonieblots“ angewandt. Dazu wurde auf die LB-Amp-Platte, die nach der Transformation über Nacht gewachsene Kolonien enthielt, eine Transfermembran (BiotraceTM NT 0,45 µm, PALL Gelman Sciences, Dreieich) kurz aufgelegt. Die auf die Membran übertragenen Bakterienkolonien wurden auf IPTG-haltige (1 mM) LB-Amp-Platten gelegt 4 h bei 37 °C inkubiert. Währenddessen wurden Petrischalen vorbereitet, in denen passend zurecht geschnittene Whatmanpapierstückchen (Whatman 3MM Chromatography Paper von Whatman, England) mit folgenden Lösungen befeuchtet wurden: 10 % SDS, Denaturierungslösung, Neutralisierungslösung und 2× SSC. Auf diesen Whatmanpapierstückchen wurde dann die bakterienhaltige Membran bei Raumtemperatur inkubiert, und zwar 10 min in 10 % SDS, 5 min in Denaturierungslösung, zweimal 5 min in Neutralisierungslösung und 15 min in 2× SSC. Danach wurde die Membran zweimal mit TBS-Puffer gewaschen und 1 h bei Raumtemperatur mit TBS-T mit 5 % Trockenmilch (Magermilchpulver von Saliter, Obergünzburg) inkubiert. Die Membran wurde zweimal 10 min mit TBS-T und einmal mit TBS gewaschen. Schließlich wurde mit der ^{RGS}His-Antikörperlösung (1:2000 in TBS) 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. (Dem inserierten Gen wurde im pQE-Vektorsystem ein Sequenzstück angehängt, das die Kodons für die Aminosäuren Arginin (R), Glycin (G), Serin (S) und dann 6 Histidine (His) enthält, welches der von der Firma Qiagen gelieferte Antikörper detektieren kann.) Nicht gebundene Antikörper wurden zwei mal 10 min mit TBS-T und einmal mit TBS abgewaschen, bevor mit dem 2. Antikörper (Peroxidasekonjugat in TBS-T) ebenfalls 1 h bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T konnte nun der Nachweis nach der ECL-Methode erfolgen (siehe Kapitel 2.20.2). Als Kontrolle wurde ein „Kolonieblot“, der nur mit dem 2. Antikörper inkubiert worden war, mit behandelt.

Denaturierungslösung:	0,5 M NaOH (20 g/l) 1,5 M NaCl (87,6 g/l)
Neutralisierungslösung:	1, 5 M NaCl (3 ml 5 M/10 ml) 500 mM Tris/HCl pH 7,4 (5 ml 1 M/10 ml)
TBS:	10 mM Tris/HCl pH 7,7 150 mM NaCl
TBS-T:	20 mM Tris/HCl pH 7,5 500 mM NaCl 0,05 % Tween20

2.21.2 Überexpression im analytischen Maßstab

Eine Kolonie einer Bakterienkultur, die den Überexpressionsvektor enthielt, wurde gepickt und in 3 ml LBG-Amp über Nacht bei 37 °C kultiviert (Schüttler Modell Kühner, B. Braun, Melsungen). Davon wurde 50 µl in 5 ml frisches Medium (1:100 Verdünnung der Kultur) gegeben und bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 – 1 kultiviert. 1 ml hiervon wurde als nichtinduzierte Kontrollfraktion abgenommen, 1 min bei 15.000 × g zentrifugiert und das Sediment in 150 µl Inkubationspuffer nach Laemmli (siehe Kapitel 2.17.1) resuspendiert. Die restlichen 4 ml wurden mit 40 µl 0,1 M IPTG induziert und weiter bei 37 °C kultiviert (Standard; im Verlauf der Experimente wurden auch andere Temperaturen und längere Zeiten getestet). Nach drei Stunden wurde zwei mal 1 ml abgenommen. Ein Aliquot (1 ml) wurde wie die nichtinduzierte Kontrollfraktion behandelt; es sollte lediglich überprüft werden, ob nach der Induktion eine (Über-)Expression des gewünschten Proteins stattgefunden hatte. Ein zweites Aliquot (1 ml) wurde zur Analyse auf das Vorhandensein von „Inclusion Bodies“ verwendet. Je 30 µl der Gesamtproben wurden mittels SDS-PAGE (siehe Kapitel 2.17.1) analysiert.

2.21.3 Präparation von „Inclusion Bodies“ (analytischer Maßstab)

(Marston *et al.* 1984, Marston 1986, Marston & Hartley 1990)

Wenn Bakterien zur Überexpression fremder Proteine angeregt werden, kann es vorkommen, daß diese in sogenannte „Inclusion Bodies“ verpackt werden. Darunter versteht man unlösliche Aggregate von Proteinen ohne biologische Aktivität, da sie nicht korrekt gefaltet sind. Aus Sicht der Bakterien kann das im Fall von für sie „ungesunden“ Proteinen von Vorteil sein, bei Wissenschaftlern sind „Inclusion Bodies“ jedoch oft unerwünscht, wenn aktives Protein isoliert werden soll. Im Fall des überexprimierten *ycf1*-Stücks war die Bildung von „Inclusion Bodies“ allerdings von Vorteil, weil sie vom Rest der Proteine einfach getrennt werden können und oft ausschließlich das gewünschte Protein und Fragmente davon enthalten, was in diesem Fall zur Isolierung des entsprechenden Proteins für die Herstellung von Antisera sehr nützlich war (The Recombinant Protein Handbook 2000).

Für die Präparation der „Inclusion Bodies“ im analytischen Maßstab wurden zwei alternative Protokolle verwendet:

Protokoll 1:

Die Bakterienkultur wurde 1 min bei $15.000 \times g$ zentrifugiert und das Sediment in 1 ml Puffer A gelöst. Nach 10 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde erneut zentrifugiert und das Sediment in 1 ml Puffer B gelöst. Nach 15 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Ansatz zweimal in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ wieder aufgetaut. Danach wurde 5 min bei $7.000 \times g$ zentrifugiert und das Sediment in 700 μl Puffer B gelöst. Nachdem noch einmal 5 min bei $7.000 \times g$ zentrifugiert worden war, wurde das Sediment schließlich in 150 μl Inkubationspuffer nach Laemmli (siehe Kapitel 2.17.1) resuspendiert.

Puffer A: 20 mM Tris/HCl pH 8 (2 ml 1 M/100 ml)
 2 mM EDTA pH 8 (400 μl 0,5 M/100 ml)
 20 % Saccharose (20 g/100 ml)

Puffer B: 50 mM Tris/HCl pH 8 (5 ml 1 M/100 ml)
 20 mM EDTA pH 8 (4 ml 0,5 M/100 ml)

Protokoll 2:

Die Bakterienkultur wurde in einem 2 ml-Reaktionsgefäß fünf mal für je 5 sec mit Ultraschall behandelt (Stufe 6, Sonifier®B12, Branson Sonic Power Company, USA), wobei die Proben zwischen den Pulsen auf Eis gehalten wurden. Danach wurde 10 min bei $15.000 \times g$ zentrifugiert und das Sediment in 150 μl Inkubationspuffer nach Laemmli (siehe Kapitel 2.17.1) resuspendiert. Der Überstand wurde mit 150 μl TCA versetzt und 5 – 10 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Sediment kurz mit 100 % Aceton gewaschen und gleich in 150 μl Inkubationspuffer resuspendiert.

2.21.4 Präparation von „Inclusion Bodies“ (präparativer Maßstab)

(Marston *et al.* 1984, Marston 1986, Marston & Hartley 1990)

500 ml bis 1 l Medium (LBG- oder M9-Amp) wurden 1:100 (bzw. 1:20 im Falle von M9) mit einer frischen Übernachtskultur der den Überexpressionsvektor tragenden Bakterien angeimpft und bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zu einer OD_{600} von 0,4 – 1 kultiviert (Schüttler Modell Kühner, B. Braun, Melsungen). Wie im analytischen Maßstab wurde auch hier 1 ml als nichtinduzierte Kontrollfraktion abgenommen (siehe Kapitel 2.21.2). Nach Zugabe von 5 ml 0,1 M IPTG wurde unter den Bedingungen weiter kultiviert, die sich im analytischen Maßstab als die mit der höchsten Ausbeute erwiesen hatten (Standard: 3 h, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$). Auch hiervon wurde danach 1 ml für eine gelelektrophoretische Überprüfung abgenommen. Der Rest der Kultur wurde 30 min bei $4.000 \times g$ zentrifugiert und das Sediment in 50 mM Tris/HCl pH 8 resuspendiert, erneut 10 min bei $5.000 \times g$ zentrifugiert und das Sediment eingefroren. Das aufgetaute Sediment wurde schließlich in höchstens 40 ml Puffer A resuspendiert. Daraufhin erfolgte der

Zellaufschluß mit der French Press (French® Pressure Cell Press von SIM AMINCO SLM Instruments Inc., Colora, München) bei 1.000 psi. Nach dem Zellaufschluß erfolgte eine Zentrifugation für 30 min bei $8000 \times g$. 20 µl des Überstandes wurden für eine gelelektrophoretische Überprüfung entnommen. Das Sediment wurde in 10 ml Lösung 2 mit Hilfe eines Glashomogenisators (Janke & Kunkel IKA®-Werke, Staufen) resuspendiert; hiervon wurden 50 µl für ein Gel entnommen. Diese Suspension wurde mit 10 ml Lösung 3 unterschichtet und 20 min bei $10.000 \times g$ zentrifugiert. Das Sediment wurde nun verschiedenen Waschschritten (a – d) unterzogen, wobei jeweils 50 µl des resuspendierten Sediments für ein Gel entnommen wurden. 20 µl des gemischten Überstandes (Saccharosegradient) wurden ebenfalls für das Gel aufbewahrt. Das saubere Sediment wurde zunächst eingefroren aufbewahrt.

Puffer A:	20 mM Tris/HCl pH8 (800 µl 1 M/40 ml) 20 % Saccharose (8 g/40 ml) 2 mM EDTA pH 8 (160 µl 0,5 M/40 ml)
Lösung 2:	50 mM Tris/HCl pH 8 (1,25 ml 1 M/25 ml) 20 % Saccharose (5 g/25 ml)
Lösung 3:	50 mM Tris/HCl pH 8 (1,25 ml 1 M/25 ml) 24 % Saccharose (10 g/25 ml)

Waschschritte a – d mit je 10 ml Lösung:

Waschlösung a:	10 mM Tris/HCl pH 8 (5 ml 1 M/50 ml) 0,1 mM EDTA pH 8 (10 µl 0,5 M/50 ml) 400 mM NaCl (6,6 ml 3 M/50 ml) 1 mM DTT (50 µl 1 M/50 ml) 0,5 % NP40 (250 µl/50 ml) 0,5 mM PMSF (250 µl 100 mM/50 ml)
Waschlösung b:	10 mM Tris/HCl pH 8 (5 ml 1 M/50 ml) 0,1 mM EDTA pH 8 (10 µl 0,5 M/50 ml) 50 mM NaCl (0,8 ml 3 M/50 ml) 1 mM DTT (50 µl 1 M/50 ml) 0,5 % NP40 (250 µl/50 ml) 0,5 mM PMSF (250 µl 100 mM/50 ml)
Waschlösung c:	10 mM Tris/HCl pH 8 (5 ml 1 M/50 ml) 0,1 mM EDTA pH 8 (10 µl 0,5 M/50 ml) 50 mM NaCl (0,8 ml 3 M/50 ml) 1 mM DTT (50 µl 1 M/50 ml) 0,5 mM PMSF (250 µl 100 mM/50 ml)

Waschlösung d:

- 10 mM Tris/HCl pH 8 (5 ml 1 M/50 ml)
- 0,1 mM EDTA pH 8 (10 µl 0,5 M/50 ml)
- 50 mM NaCl (0,8 ml 3 M/50 ml)
- 1 mM DTT (50 µl 1 M/50 ml)
- 1 M Harnstoff (3 g/50 ml)
- 0,5 mM PMSF (250 µl 100 mM/50 ml)

Zur Gewinnung eines Antiserums wurde das gereinigte Protein in hoher Konzentration auf einem Laemmligel (Kapitel 2.17.1) aufgetrennt, im Gel mittels jeweils einer halben Stunde Inkubation mit 1 % Triton X-100 und 0,1 % Triton X-100 weitgehend vom SDS befreit und dann nur kurz (1/2 h) bei Raumtemperatur mit Coomassie angefärbt (Siehe Kapitel 2.18.1). Das Proteinfragment wurde ausgeschnitten und zwischen zwei Glasplatten zerstoßen. Das so homogenisierte Gelstück wurde daraufhin der Firma pab-productions in Hebertshausen zur Immunisierung eines Kaninchen geschickt.

2.22 Computerarbeit

Zur Analyse von Daten und zur Recherche wurden folgende Computerprogramme bzw. Internetseiten verwendet:

- DNA-Sequenzanalysen: Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)
Webcutter 2.0 (<http://www.firstmarket.com/cutter/cut2.html>)
Seqinput (Holger Hupfer)
BioEdit 5.0.9 (<http://www.mbio.ncsu.edu/RNaseP/home.html>)
- Methoden: Molecular Cloning. A laboratory manual on the web. Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001). (<http://www.molecularcloning.com>)
- Literaturrecherche: PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/>)
- Bildverarbeitung: TINA 2.0
Adobe Photoshop 5.5
CorelDraw 8
- Erstellung: Microsoft Word 97
Microsoft Powerpoint 97

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchungen zu *ycf1*

Ycf1 (Positionen auf dem Tabakchromosom: 131.594 – 125.889) gehört zu den letzten offenen Leserastern in Plastiden höherer Pflanzen, bei denen die Funktion des Genprodukts noch völlig unbekannt ist. Die vorliegenden Untersuchungen hatten das Ziel, Hinweise darauf zu erhalten.

3.1.1 *ycf1*-Transkription

Der Nachweis der *ycf1*-Transkription erwies sich als schwierig, da es sich offenbar um ein extrem schwach exprimiertes Gen handelt (siehe Abbildung 2). Im gezeigten „Northern Blot“ wurden RNA-Proben aus verschiedenen Geweben mit einer *ycf1*-spezifischen Sonde aus dem 5'-Bereich des Gens (PCR-Produkt von Tabak-DNA mit den „Primern“ *ycf1*-a und *ycf1*-b) hybridisiert. *Ycf1* soll sowohl von der plastidenkodierte RNA-Polymerase (PEP) als auch der kernkodierte (NEP) transkribiert werden (Hajdukiewicz *et al.* 1997); in einigen Geweben konnte ein Signal bei den mitgetesteten Δrpo -Pflanzen (Mutanten mit deletierten *rpo*-Genen und damit keiner funktionellen plastidären RNA-Polymerase) gefunden werden. Die stärkste Transkription wurde bei Blattprimordien (meristematisches Gewebe) und Stengeln sowohl von Wildtyp als auch von Δrpo -Pflanzen beobachtet (Abbildung 2, B-C und F-G). Die Blotmembran mußte aufgrund der geringen *ycf1*-Expression lange exponiert werden, so daß teilweise unspezifische rRNA-Fragmente sichtbar werden, die den größten Anteil an RNA in der Zelle darstellen.

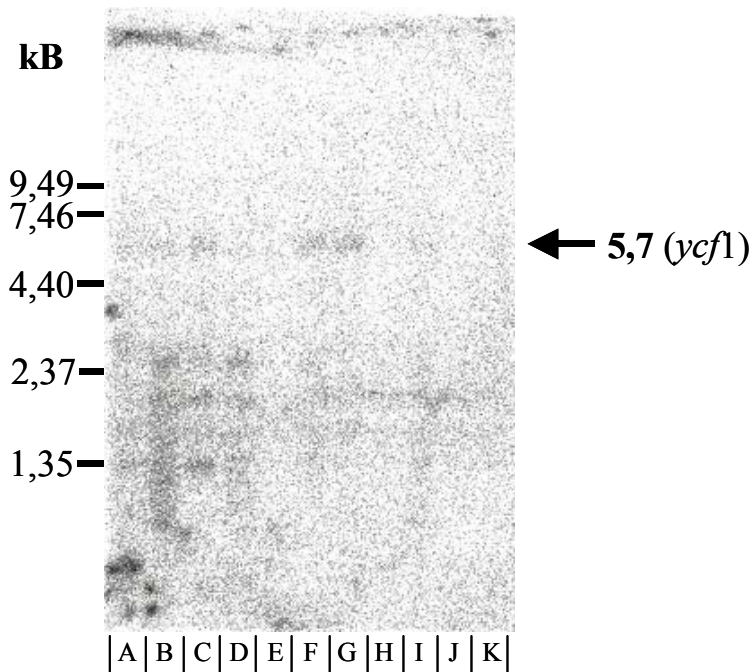


Abbildung 2: Northernanalyse von Tabak-RNA mit *ycf1*-spezifischer Sonde

A: WT Wurzel B: WT Stengel C: Δrpo Stengel D: WT Blüten E: Δrpo Blüten F: WT Blattprimordien G: Δrpo Blattprimordien H: WT Blätter I: Δrpo Blätter J: WT gesamt K: Δrpo gesamt.

(Das Δrpo -Material wurde freundlicherweise von Julia Legen und Christian Schmitz-Linneweber zur Verfügung gestellt.)

3.1.2 Inaktivierung von *ycf1*

Zunächst wurde die Strategie der reversen Genetik angewandt. Das bedeutet, daß durch Inaktivierung eines Gens indirekt Aufschluß über dessen Funktion erhalten werden soll. Gegenstand der Untersuchung sollen dabei physiologische Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutanten ohne das funktionelle Gen sein.

Hierzu wurden bereits im Zuge meiner Diplomarbeit zwei Konstrukte für die Chloroplastentransformation hergestellt (siehe Abbildung 3). In einem Fall wurde vor Einsetzen der *aadA*-Kassette (siehe Kapitel 2.6.2.3) der größte Teil des Gens deletiert (4.831 Bp), im zweiten Fall die *aadA*-Kassette in das vollständige Gen inseriert. Plastiden wurden mit je einem der beiden Konstrukte mittels Partikelkanone transformiert (siehe Kapitel 2.6.2.2). Da sich schon sehr früh ein stabiles Gleichgewicht zwischen Wildtyp- und transformiertem Genom einstellte, was auch auf nicht-selektivem Medium nicht zu entmischen war, muß davon ausgegangen werden, daß es sich bei *ycf1* um ein essentielles Gen handelt (Drescher *et al.* 2000).

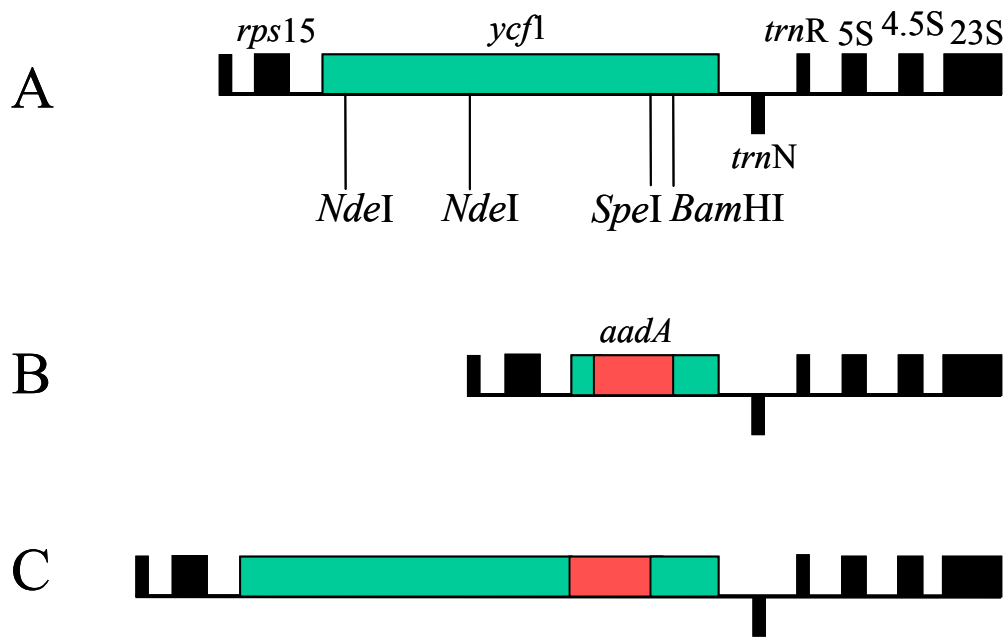


Abbildung 3: Konstruktion der *ycf1* „knock-out“-Vektoren

A: *ycf1*-enthaltendes Stück Tabakwildtypgenom, das als Ausgangs-„Insert“ in einen Vektor integriert wurde.

B: Deletion des „Inserts“ A durch Schneiden mit den Restriktionsenzymen *BamHI* und *NdeI*, dort wurde dann die *aadA*-Kassette inseriert.

C: Insertion der *aadA*-Kassette in die *SpeI*-Schnittstelle von „Insert“ A.

Im Laufe der vorliegenden Arbeit wurden diese Transformanten weitergehend untersucht. Nachdem die *ycf1*-„knock-out“-Mutanten aus der Gewebekultur in Erde überführt wurden, fielen an einigen Blättern beider Mutanten (sowohl Deletions- als auch Insertionsmutante, B bzw. C der Abbildung 3) morphologische Unterschiede zu Wildtyptabak auf: In vielen Fällen war das Gewebe an den Rändern der farblich vom Wildtyp nicht zu unterscheidenden Blätter nekrotisch, was ihnen ein verschrumpeltes Aussehen verlieh, und die Blätter auch optisch verschmälerte (siehe Abbildung 4). Die nekrotischen Bereiche konnten nach Oberflächensterilisation nicht in der Gewebekultur regeneriert werden. In abgeschwächter Form waren helle bis weiße Flecken an den Rändern zu erkennen. Diese wiesen in der Elektronenmikroskopie stark veränderte, kleinere Chloroplasten auf (siehe Abbildung 5): Auffällig ist das Fehlen von Thylakoidmembranstapeln, was auch die helle Färbung der betroffenen Regionen erklärt. Dafür scheinen diese ungewöhnlich strukturierten Chloroplasten noch zur Teilung befähigt (siehe Abbildung 5-B). In weiter zum Blattinnern liegenden Bereichen, wurden (teilweise sogar innerhalb einer Zelle) zusätzlich augenscheinlich Wildtypchloroplasten beobachtet. Nur im äußersten Blattbereich waren die Mutantenchloroplasten in größerer Anzahl vorhanden.

Es gelang nicht, diese nach Chloroplastenisolation aus den Blatträndern in verkleinertem Ansatz von den zahlenmäßig dominierenden Wildtypchloroplasten zu trennen.

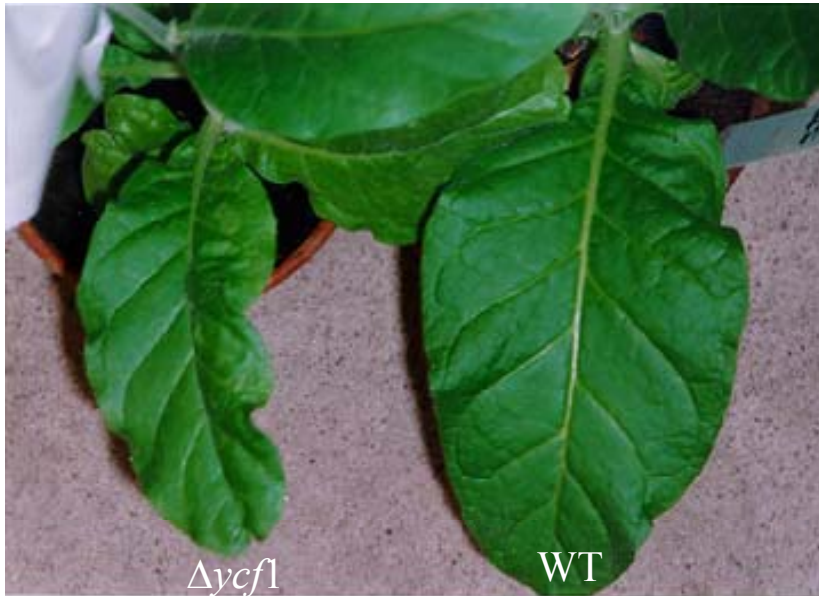


Abbildung 4: Morphologie der *ycf1*-„knock-out“-Mutanten

Im Vergleich zum Wildtyp waren die Blätter oft schmaler und wiesen helle Flecken an den Blatträndern oder im Extremfall verschrumpelte Ränder auf.

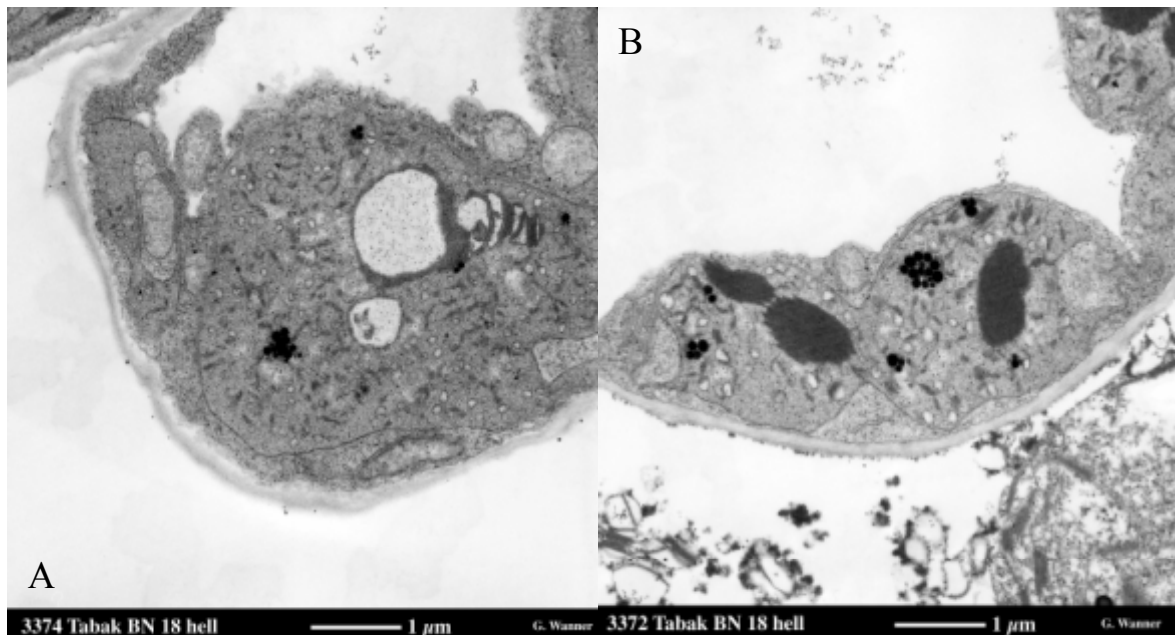


Abbildung 5: Elektronenmikroskopische Darstellung der *ycf1*-„knock-out“-Mutanten

Gezeigt sind Chloroplasten der hellen Blattränder (siehe Abbildung 4). Auffällig ist das Fehlen von Thylakoidmembranstapeln. Dafür ist in A eine an einen Golgi-Apparat erinnernde Struktur zu erkennen und in B sieht man, daß auch diese ungewöhnlich strukturierten Chloroplasten zur Teilung befähigt sind.

Diese leichten morphologischen Auffälligkeiten der Blattränder waren der einzige Unterschied den die heteroplastomischen *ycf1*-„knock-out“-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp-tabak zeigten. Sie blühten und bildeten fertile Samen aus. Da Plastiden von Tabak üblicherweise nur maternell vererbt werden und eine Eizelle höchstens 10 – 20 Plastiden mit jeweils wenigen Genomkopien in die nächste Generation überführt, kann dies zur Entmischung der Genome führen, wie das für das Weidenröschen *Epilobium anqustifolium* ausführlich berechnet wurde (Michaelis 1966). Es bestand also die Hoffnung, auf diesem Wege homoplastomische Linien, die nur noch das transformierte Genom und nicht mehr zusätzlich das Wildtypgenom enthalten, zu bekommen. Jedoch erwies sich das Gleichgewicht zwischen Wildtyp- und transformiertem Genom auch in den Samen als stabil. Es wurden lediglich zusätzlich Keimlinge mit reinem Wildtypplastom gefunden. Diese sind auf selektivem Medium ausgebleicht und nicht in der Lage, sich zu einer ausgewachsenen Pflanze weiter zu entwickeln (siehe Abbildung 6), denn da in deren Plastomkopien die *aadA*-Kassette nicht vorhanden ist, wird die Chloroplastentranslation durch das Spectinomycin im Medium gehemmt.



Abbildung 6: Keimlinge aus Samen der *ycf1*-„knock-out“-Mutanten (F1)

Auf selektivem Medium sind Wildtypkeimlinge ausgebleicht und unfähig, weitere Blätter zu bilden. Hier eine Petrischale mit ausgesäten Keimlingen der Insertionsmutante. Die grünen Keimlinge der ersten Generation (F1) unterscheiden sich nicht von den ursprünglichen *ycf1*-„knock-out“-Mutanten nach der Transformation. Das Gleichgewicht von Wildtyp- zu Mutantengenom stellt sich in der RFLP-Analyse unverändert dar.

3.1.3 Promotoraustausch von *ycf1*

Da mit der Strategie der reversen Genetik aufgrund des Nichterhaltens homoplastomischer Linien keine weiteren Erkenntnisse gewonnen werden konnte, wurde in einem quasi umgekehrten Ansatz versucht, *ycf1* durch Promotoraustausch zu überexprimieren, wobei auch gleichzeitig durch die Wahl eines induzierbaren Promotors ein „knock-out“ möglich werden sollte. Verwendet wurde hierbei der blaulichtinduzierte Promotor von *psbD*. Dieser Promotor ist ausführlich untersucht worden und kommt hochkonserviert in sämtlichen Angiospermen und sogar schon in Cyanobakterien vor (Christopher *et al.* 1992). Die Induzierbarkeit dieses *psbD*-Promotors wurde ausführlich getestet, indem er zusammen mit dem Markergen *uidA* (GUS) transformiert wurde (Allison & Maliga 1995). Im Diskussionsteil wird noch ausführlicher auf die Wahl dieses Promotors eingegangen (siehe Kapitel 4.1.3).

Zur Herstellung des Konstrukts für den Promotortausch, das später in die Chloroplastentransformation eingesetzt werden sollte, mußten zunächst passende Schnittstellen für Restriktionsenzyme per PCR eingeführt werden und der *ycf1*-Promotor (Abbildung 35) deletiert werden (siehe Abbildung 7). Dazu wurden ein 1.272 Bp großes PCR-Produkt (mit den „Primern“ Pycf1-SacII und 5S-SacII amplifiziert), welches den Bereich des Tabakplastoms vom 5S-Gen bis direkt vor den *ycf1*-Promotor umfaßt, und der Vektor pBS II SK- mit dem Restriktionsenzym *SacII* geschnitten und miteinander ligiert. Dieses Konstrukt (Abbildung 7-B rechts) wurde mit den Restriktionsenzymen *Eco32I*, welches glatte Enden hinterläßt, und *XbaI* geschnitten. Ein zweites 1.288 Bp großes PCR-Produkt (mit den Primern *ycf1*-a und Pycf1-XbaI aus Tabak-DNA amplifiziert), welches die 5'-UTR hinter dem *ycf1*-Promotor umfaßt und bis ins *ycf1*-Gen hinreicht, wurde mit dem Restriktionsenzym *BspEI* und nach Klenowbehandlung mit *XbaI* geschnitten (Abbildung 7-B links). Hierdurch wurde das PCR-Produkt auf 948 Bp gekürzt und dann nach Elution aus einem Agarosegel in den obigen Vektor ligiert. Damit entstand ein Konstrukt mit deletiertem *ycf1*-Promotor (siehe Abbildung 7-C).

Parallel wurde der *aadA*-Kassette der *psbD*-Promotor angehängt. Dafür wurde zunächst der *psbD*-Promotor aus Tabak-DNA mittels PCR amplifiziert (mit den „Primern“ BglIXbaPpsbD-rev und ClaPpsbDfor, die zusätzliche Restriktionschnittstellen enthalten) und in den TA-Vektor ligiert. Mit *DpnI*, welches glatte Enden hinterläßt, wurde der Promotor ausgeschnitten (224 Bp, siehe Abbildung 37), da aber der Vektor zu viele *DpnI*-Schnittstellen enthält, wurde zunächst mit *HincII* und *SpeI* der größte Teil des Vektors entfernt. Dieser Schritt war notwendig, da das PCR-Produkt alleine nicht verwendet werden konnte, weil *DpnI* eine

methylierte Erkennungssequenz hat (siehe Tabelle 1). Gleichzeitig dazu wurde der die *aadA*-Kassette enthaltende Vektor pBSaadA+ mit *Acc65I* gespalten und die Enden mit dem Klenowenzym geglättet. Nach Ligation von *aadA*-Kassette und *psbD*-Promotor (Abbildung 7-D) wurde dieses Konstrukt mit Hilfe des Restriktionsenzym *XbaI* anstelle des deletierten *ycf1*-Promotors eingefügt (Abbildung 7-E). Die komplette *aadA*-Kassette liegt in der gleichen Leserichtung wie das *ycf1*-Gen vor. Nachdem die Richtigkeit des Konstrukts durch Sequenzierung überprüft worden war, wurde es mittels Partikelkanone in Tabakblätter transformiert.

Abbildung 7: Herstellung des Konstrukts zum Promotoraustausch von *ycf1*

(nächste Seite)

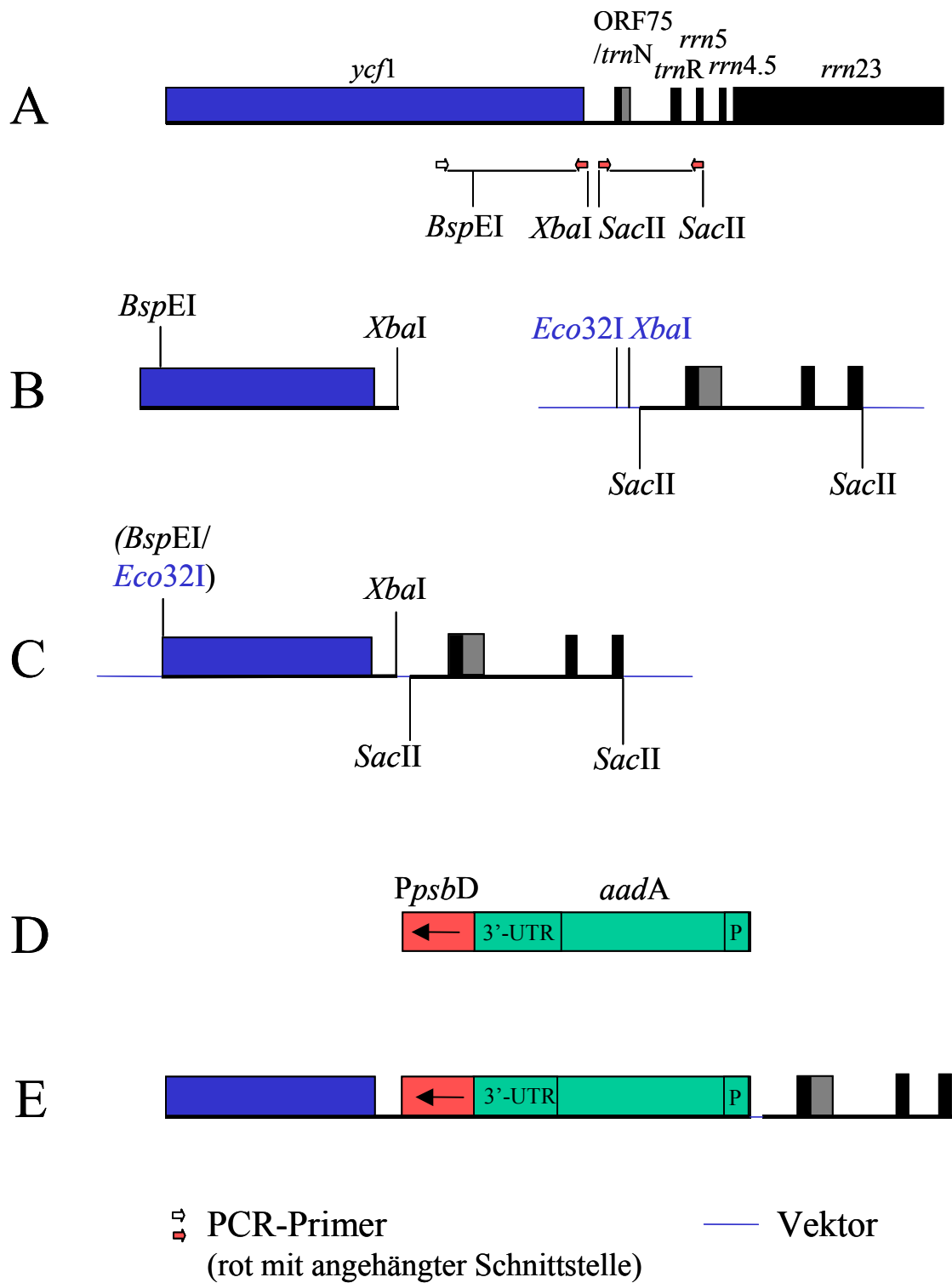
A: Teilbereich des Tabakplastidengenoms, aus dem wie eingezeichnet zwei Stücke per PCR mit „Primern“ amplifiziert wurden, denen die angegebenen Schnittstellen für Restriktionsenzyme angehängt worden waren.

B: (vergrößerter Maßstab im Vergleich zu A, Vergrößerung 2×) die beiden PCR-Produkte; das rechts dargestellte PCR-Produkt wurde in einen Vektor ligiert, dessen Restriktionsschnittstellen (blau) für den weiteren Verlauf verwendet wurden.

C: Zusammenführen der beiden PCR-Produkte; Ergebnis ist ein deletierter *ycf1*-Promotor.

D: der amplifizierte Bereich des *psbD*-Promotors (Leserichtung wird durch den Pfeil angezeigt) wurde mit der *aadA*-Kassette verbunden.

E: an Stelle des *ycf1*-Promotors wurde in das Konstrukt C nun der *psbD*-Promotor mit der *aadA*-Kassette (D) eingefügt. 3'-UTR bezeichnet die 3'-regulatorische Region, P den Promotor der *aadA*-Kassette.



Nach erfolgreicher Transformation wurden Blattstückchen auf selektivem Medium regeneriert und mit PCR auf Vorhandensein des transformierten Konstrukts (mit den *aadA*-spezifischen „Primern“ *aadAli59* und *aadAre60*) und durch RFLP-Analyse mit *ycf1*-spezifischer Sonde (PCR-Produkt von Tabak-DNA mit den „Primern“ *ycf1-a* und *ycf1-b*) auf das Verhältnis von Wildtyp- zu transformiertem Genom getestet. Dabei wurden die Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen so gewählt, daß sich eine außerhalb des Konstrukts befindet (hier die *EcoRI*-Schnittstelle innerhalb des *ycf1*-Gens) und damit auch die Integration an der richtigen Stelle des Genoms überprüft (siehe Abbildung 8). Da sich die Sonde im 5'-Bereich des *ycf1*-Gens befindet, der Teil der „Inverted Repeats“(IR)-Region des Plastoms ist, bekommt man zusätzlich zu den Fragmentgrößen von 2.275 Bp für Wildtypplastomkopien und 3.516 Bp für transformierte Genomkopien, jeweils Signale, die dem anderen IR entspringen: 1.759 Bp im Wildtyp und 3.000 Bp in Transformanden (siehe Abbildung 9).

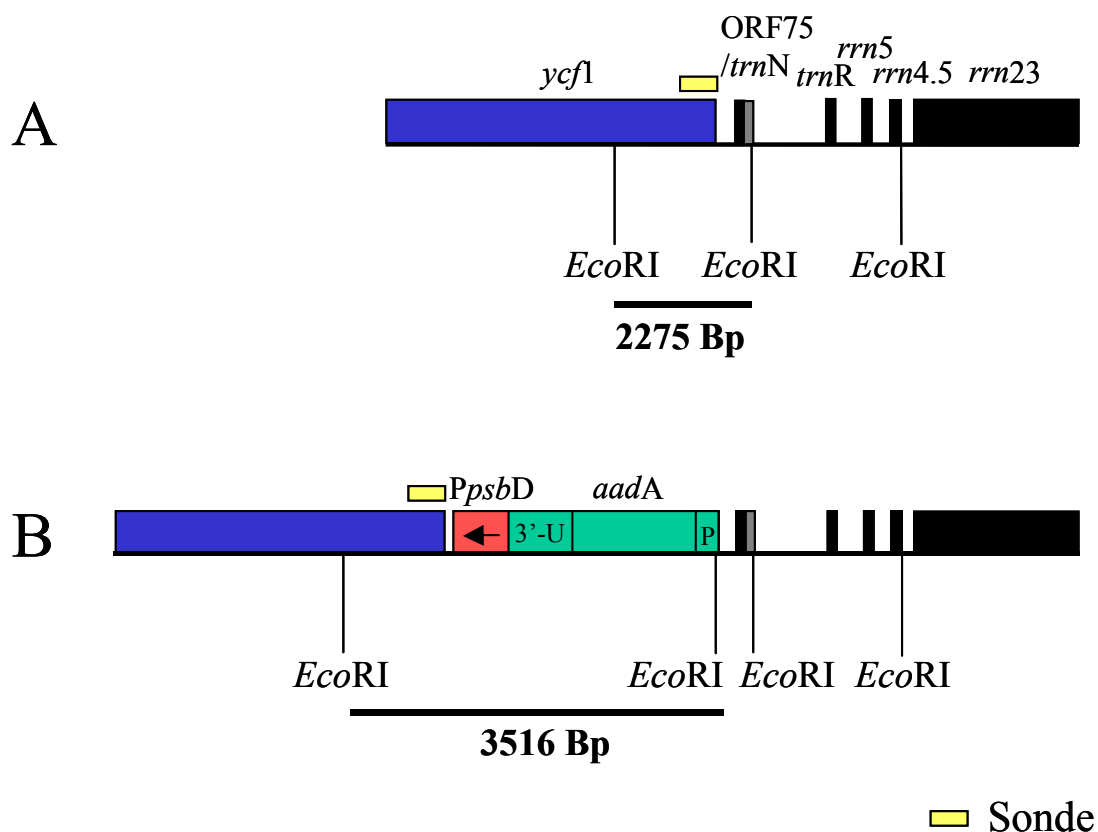


Abbildung 8: Erläuterung der Fragmentgrößen der *ycf1PDa*-RFLP-Analyse

A: erwartete Größe des Wildtypgenoms nach Hybridisierung mit der eingezeichneten *ycf1*-Sonde nach Restriktion mit *EcoRI*.

B: erwartete Größe der *ycf1PDa*-Genomkopien.

3'-U bezeichnet den 3'-regulatorischen Bereich (3'-UTR), P den Promotor der *aadA*-Kassette.

Wie Tabelle 5 zeigt, konnten mehrere Transformandenlinien gewonnen und untersucht werden, wobei ycf1PDa-1 schon von der ersten Regenerationsrunde an nur noch einen geringen Anteil an Wildtypgenom aufwies (siehe Abbildung 9-A). Da jedoch in unterschiedlichen Bereichen des Pflänzchens das Verhältnis von Wildtyp- zu Transformanden-genom variierte, wurden aus dem Ausgangsspross eine Reihe individueller Pflanzen generiert und untersucht (siehe Abbildung 9-B). Diese wurden in Erde überführt und im Gewächshaus zum Blühen gebracht, wonach fertile Samen gewonnen werden konnten. Die Pflanzen waren morphologisch nicht vom Tabakwildtyp zu unterscheiden.

<i>Bezeichnung</i>	<i>Aussehen</i>	<i>PCR</i>	<i>Southern</i>
ycf1PDa-1, I	helle fleischige Blättchen	+	+
ycf1PDa-2, I	helles Pflänzchen	+	+
ycf1PDa-3, II	grüner Callus	-	-
ycf1PDa-4, II	grünes Pflänzchen	+	(+)
ycf1PDa-5	helle fleischige Blättchen		
ycf1PDa-6, I	grünes Pflänzchen	-	-
ycf1PDa-7, I	grünes Blättchen	+	+

Tabelle 5: Liste der potentiellen Transformanden nach Transformation mit ycf1PDa

Römische Zahlen hinter den Bezeichnungen der potentiellen Transformanden benennen die höchste Regenerationsrunde, in der Blattstückchen für die aufgeführten Untersuchungen entnommen wurden.

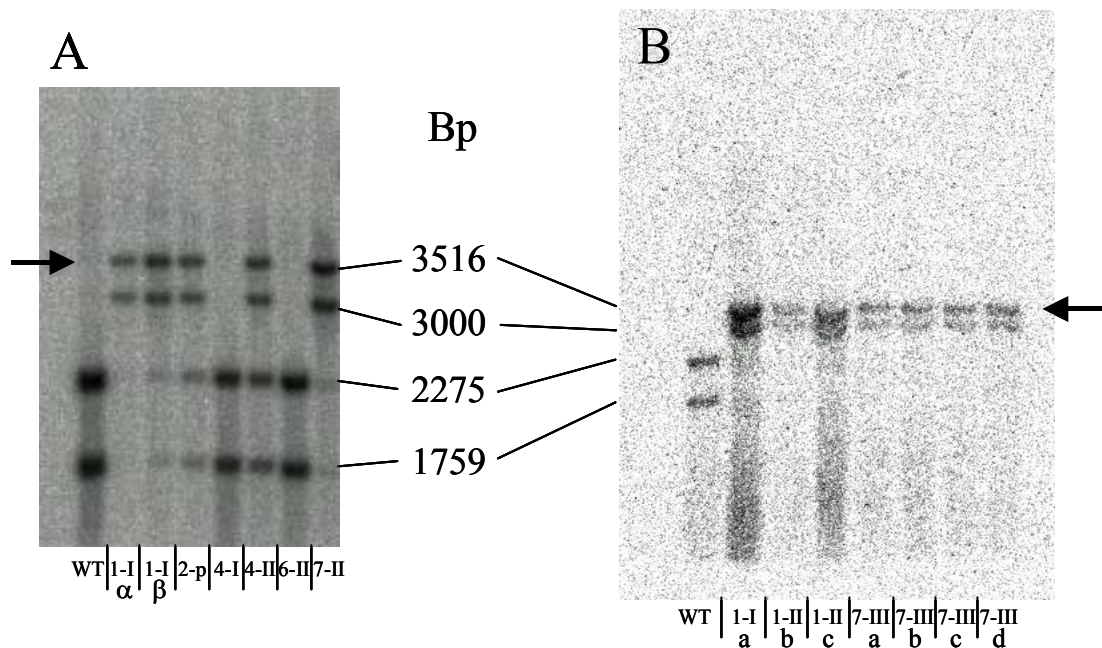


Abbildung 9: Southernanalyse der potentiellen ycf1PDa-Transformanden

A: Analyse der ersten Sprosse (siehe Tabelle 5)

B: Untersuchung weiter kultivierter Pflanzen, die die Transformation aufwiesen.

Erläuterung der Fragmentgrößen siehe Abbildung 8. Römische Zahlen bezeichnen die Regenerationsrunde, in der sich die untersuchten Pflanzen befanden, a-d sind Individuen, die aus den ursprünglichen Pflanzen generiert wurden, α und β verschiedene Bereiche eines Sprosses. Die Pfeile weisen auf die gesuchte Fragmentgröße der Transformanden hin.

3.1.4 Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) der ycf1-Mutanten

Weil sich außerhalb der Plastiden, im Mitochondrien- und Kerngenom, zahlreiche Kopien von Plastidengenomen befinden (Ellis 1982, Zeltz *et al.* 1996, Ayliffe *et al.* 1998), die als promiskuitive DNA PCR-Signale verursachen können, erhält man mitunter auch bei homoplastomischen Linien noch „Wildtypsignale“. Mit Hilfe der Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) kann plastidäre DNA jedoch sauber isoliert werden, so daß dies eine sichere Methode darstellt, Transformanden auf ihr Verhältnis von Wildtyp- zu Transformandengenom zu überprüfen (Swiatek *et al.* 2003). Ebenso sind eventuelle Anomalien bei der Größe plastidärer Chromosomen und Polymerbildung der Chromosomen beobachtbar.

Tabakpflanzen der beiden „knock-out“-Mutanten, der Promotoraustauschmutante und vom Wildtyp wurden in Gläsern in der Gewebekultur herangezogen, bis die Blätter ca. 10 cm groß

waren. Aus diesen wurden Chloroplasten isoliert, die wie in Kapitel 2.10.3 beschrieben in Blöckchen für die Pulsfeldgelelektrophorese überführt wurden. Als Marker dienten Concatemere des 48,5 kB langen Genoms des Phagen λ . Bei einer Genomgröße von knapp 156 kB laufen Tabakplastidenchromosomen nahe über dem dritten Concatemer, deren Polymere entsprechend über dem sechsten, neunten usw. (siehe Abbildung 10). Das ist im Fall von Wildtyp und Promotoraustauschmutante auch zu erkennen. Die heteroplastomischen „knock-out“-Mutanten weisen jedoch noch zusätzliche, größere Fragmente auf. Man muß dort also vom Vorhandensein zweier Chromosomtypen unterschiedlicher Größe ausgehen.

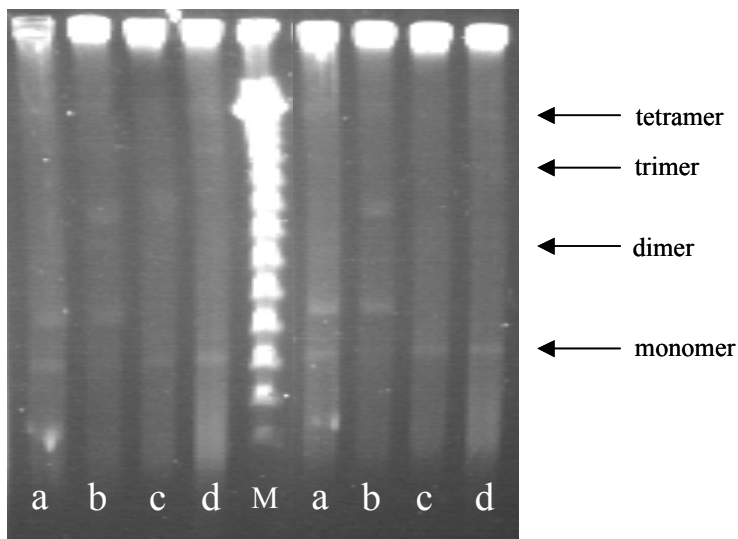


Abbildung 10: Pulsfeldgelelektrophorese der *yef1*-Mutanten

a: Deletionsmutante

b: Insertionsmutante

c: *yef1*PDa-Mutante

d: Tabakwildtyp

M – Marker

Wildtypmono- und entsprechende Polymere sind bezeichnet, in den Spuren a und b sind Fragmente von abweichender Größe erkennbar.

3.1.5 Überexpression von *ycf1* in *E.coli* zur Antikörpergewinnung

Da mit der Strategie der reversen Genetik aufgrund des Nichterhaltens homoplastomischer Linien keine weiteren Erkenntnisse gewonnen werden konnten, sollten mit Hilfe von Antikörpern gegen das Ycf1-Protein Hinweise auf Wirkort und –zeitpunkt des *ycf1*-Produkts gefunden werden, und so Aufschluß über seine Funktion gewonnen werden.

Für die Überexpression von Proteinen in *E.coli* gibt es verschiedene Vektorensysteme, die als Grundausstattung über ein Start- und ein Stoppkodon mit einer „Multiple Cloning Site“ dazwischen verfügen, wobei der Vektor mit dem passenden Leseraster gewählt werden muß. Oft passiert es, daß die Bakterienzellen das fremde Protein schnell wieder abbauen oder gar nicht erst komplett synthetisieren können; besonders hydrophobe oder lange Proteine bereiten Probleme. Man spricht von „premature termination“, wenn es nicht gelingt, die volle Länge eines Proteins zu synthetisieren.

Bei einem Gen von 5.706 Bp Länge wie *ycf1* kann man also nicht unbedingt davon ausgehen, daß es möglich ist, das komplette Protein (erwartetes Molekulargewicht 220 kDa) zu überexprimieren. Es wurden daher verschieden lange Stücke, die die hydrophilsten (und damit als potentielle Antigenregionen vermuteten) Bereiche beinhalten sollten, in verschiedenen Vektorsystemen getestet. Ebenso wurden verschiedene Bakterienstämme eingesetzt. Zunächst wurden zwei PCR-Produkte amplifiziert, denen mit ihren „Primern“ (*ycf1*for-SacI mit *ycf1*-rev-PstIa und mit *ycf1*rev-PstIb) Restriktionsschnittstellen angefügt wurden, die in allen Vektoren zu finden waren. Mit PCR-Produkt 1 (Üy1-a), dessen Länge 1851 Bp betrug, wurde ein Protein mit 638 Aminosäuren, welches einem Molekulargewicht von ca. 80 kDa entspricht, erwartet. PCR-Produkt 2 (Üy1-b) mit einer Länge von 2.581 Bp sollte die maximal erreichbare Größe von 881 Aminosäuren, also knapp über 100 kDa, ergeben. Zunächst wurden die beiden PCR-Produkte nach Restriktion mit *SacI* und *PstI* in den ebenfalls mit diesen beiden Enzymen geschnittenen Vektor pQE31 ligiert. Bei diesem Vektorsystem ist dem gewünschten Protein eine kurze Aminosäuresequenz vorangestellt, gegen die beim Hersteller des Vektors erhältliche Antiseren reagieren (^{RGS}His Antikörper, QIAexpress Detection System, Qiagen, Hilden), so daß das überexprimierte Protein mittels „Kolonieblot“ nachgewiesen werden kann (siehe Abbildung 11). Darüber hinaus bietet sich die Möglichkeit, die sechs Histidine der Erkennungssequenz an Nickel-NTA zu binden und so das gewünschte Protein aus einem Proteinextrakt zu isolieren (Nickel-NTA-Affinitätschromatographie). Nach Sequenzierung des „Inserts“, um die korrekte Sequenz und vor allem ihr Leseraster zu über-

prüfen, und Transformation in die *E.coli*-Stämme M15, SG13009, B121 und LysS wurde durch Induktion mit IPTG die Überexpression des gewünschten Proteins angeregt. Es konnte kein Proteinfragment erwarteter Größe ausgemacht werden, deren Anteil sich nach Induktion vergrößerte. Mit Hilfe des „Kolonieblots“ konnte allerdings gezeigt werden, daß im Falle von Üy1-a das Protein exprimiert wurde (siehe Abbildung 11). Es wurde auch deutlich, daß keinesfalls alle Bakterienkolonien das gewünschten Proteins aufweisen. Jedoch war auch bei gezieltem Einsatz einer Bakterienkolonie, der Expression des gewünschten Proteins nachgewiesen werden konnte (siehe Umrandung in Abbildung 11), die Expression so gering, daß sie in einem mit Coomassie gefärbten PAGE-Gel kaum zu erkennen war, so daß die Mengen zur Isolierung für die Antikörpergewinnung keinesfalls ausgereicht hätten.

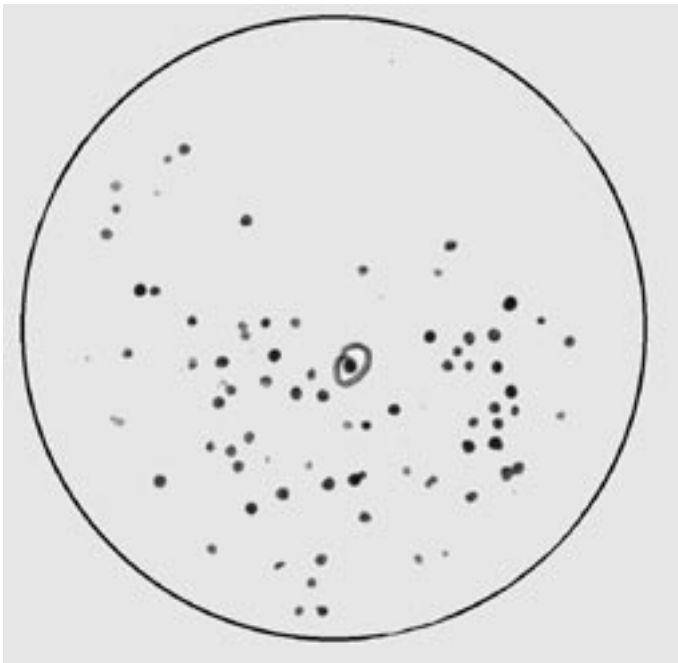


Abbildung 11: „Kolonieblot“

Nachgewiesen wurde Üy1-a in pQE31 in LysS (^{RGS}His Antikörper, QIAexpress Detection System, Qiagen, Hilden). Die Kolonie, die gepickt wurde, um eine Überexpression in größerem Maßstab zu initiieren, ist hier eingekreist dargestellt.

Das „Insert“ Üy1-a (Üy1-b war wie erwartet offenbar zu groß für die Überexpression) wurde, in der Hoffnung mit diesem System eine stärkere Expression zu erhalten, in den Vektor pRSET5b überführt. Parallel dazu wurde Üy1-a mit *EcoRI* und *BamHI* auf 957 Bp gekürzt (=Üy1-c, erwartetes Molekulargewicht ca. 40 kDa) und in beide Vektorsysteme ligiert, wobei im Falle des pQE-Systems nach der Restriktion mit *EcoRI* zunächst eine Behandlung mit dem Klenowenzym erfolgte, weil dort neben der *BamHI*-Schnittstelle in die glatte Enden hinterlassende *Ecl136II*-Schnittstelle ligiert werden mußte. Üy1-c in pRSET5b ergab schließlich die gewünschte Überexpression (siehe Abbildung 12).

Die Überexpression des 957 Bp-Stücks (analytischer Maßstab, siehe Kapitel 2.21.2) erfolgte parallel in den Bakterienstämmen B121 und LysS. Nach der Transformation wurden diese über Nacht vorkultiviert und wie beschrieben zur Überexpression des gewünschten Proteins angeregt. Aufgetragen auf ein 15 % SDS-PAGE-Gel wurde jeweils vor der Induktion mit IPTG (-) und 3 Proben nach 3 Stunden Inkubation: Unbehandelte Bakterienkultur und „Inclusion Bodies“-Präparation so wie deren Überstand (siehe Kapitel 2.21.3). Wie in Abbildung 12 zu erkennen, fingen die Bakterien bereits vor der Induktion an, kleine Mengen des Proteins zu synthetisieren. Da ein großer Teil des exprimierten *ycf1*-Stücks in „Inclusion Bodies“ gepackt wurde, konnte es durch eine Isolierung dieser in großem Maßstab gewonnen werden (Kapitel 2.21.4). Auffällig ist auch ein kürzeres Proteinfsegment bei ca. 32 kDa. Dieses konnte zusammen mit weiteren Minderkomponenten der „Inclusion Bodies“-Fraktion als Bruchstücke des 40 kDa-Proteins identifiziert werden.

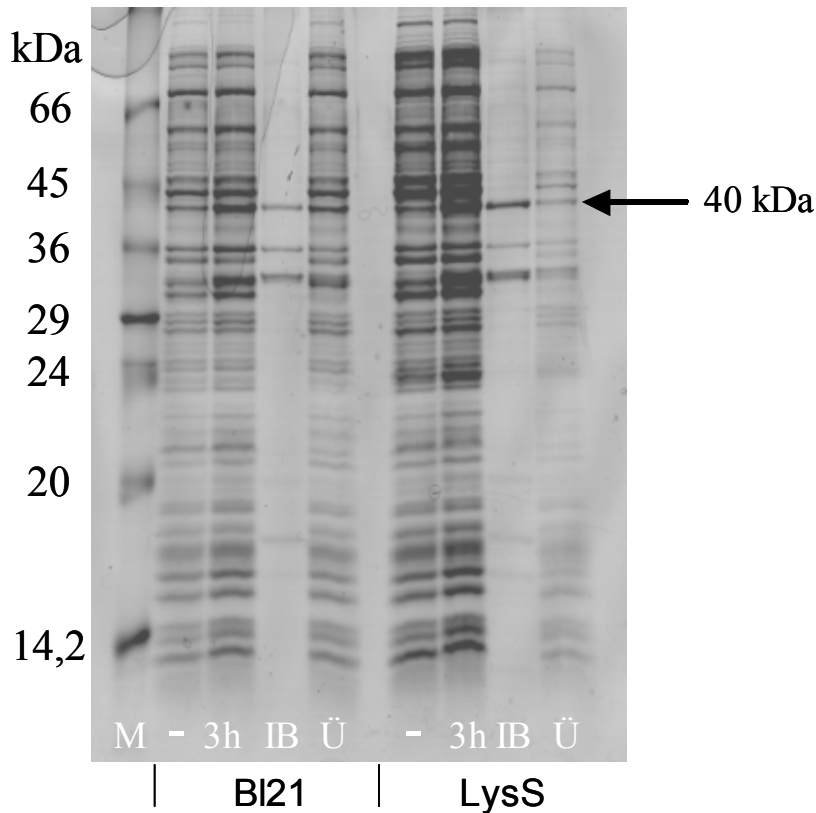


Abbildung 12: Überexpression des 957 Bp-Fragments von *ycf1*

Aufgetrennt über SDS-PAGE (15 %) wurden Proben (Überexpression analytischer Maßstab) der Bakterienstämme BI21 und LysS.

(-) vor der Induktion mit IPTG, (3h) uninduzierte Bakterienkultur 3h nach der Induktion, (IB) „Inclusion Bodies“-Präparation 3h nach der Induktion, (Ü) Überstand der „Inclusion Bodies“-Präparation 3h nach der Induktion. Der Pfeil zeigt auf das gewünschte Fragment bei ca. 40 kDa.

Für die Immunisierung eines Kaninchens wurden ca. 500 µg der „Inclusion Bodies“-Präparation auf ein 15 % Laemmligel geladen, welches, wie in Kapitel 2.21.4 beschrieben, nachbehandelt wurde. Hieraus wurde das ca. 40 kDa große Fragment ausgeschnitten und in die Immunisierung eingesetzt. Danach wurden regelmäßig Seren auf Reaktion gegen die „Inclusion Bodies“-Präparation und später auch gegen Tabakproteinfraktionen getestet, bis das Serum mit der klarsten Reaktion identifiziert war (siehe Abbildung 13). Ca. 30 µg wurden getrennt geladen und ebenfalls ausgeschnitten und in zehnpromzentiger Essigsäure gelöst an Dr. Müller (AG Eichacker) übergeben. Die Sequenzierung konnte das Protein als Teil von Ycf1 identifizieren.

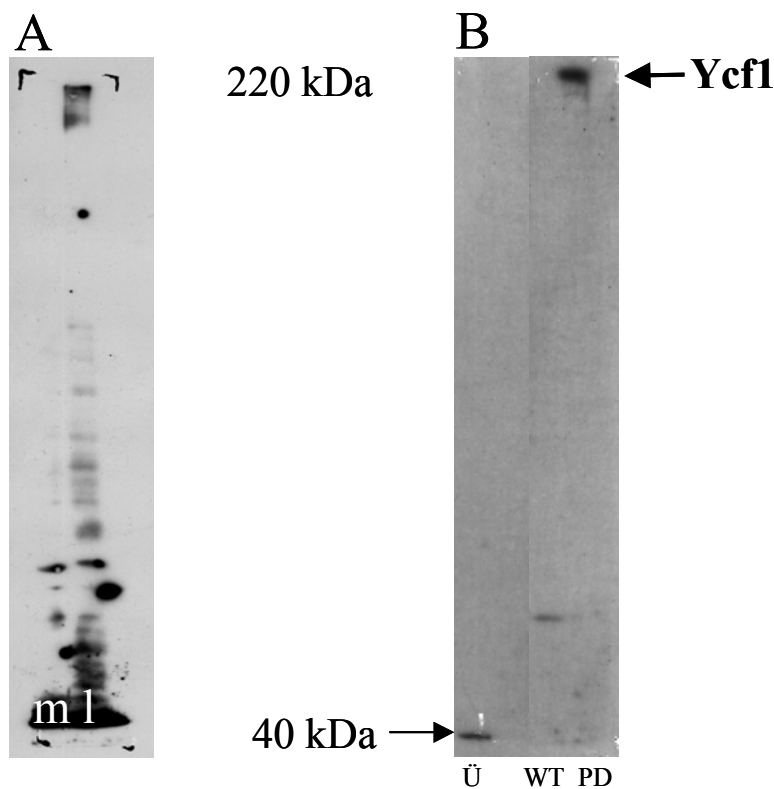


Abbildung 13: Westernanalyse mit dem Ycf1-Antiserum

A: „Western Blot“ zur Aktivitätskontrolle des Antiserums (7. Blutung) gegen Tabakproteinfractionen.

B: „Western Blot“, um die Expression der Promotormutanten nachzuweisen; als Positivkontrolle wurden die „Inclusion Bodies“ verwendet, die auch zur Immunisierung des Kaninchens herangezogen wurden (Ü).

m – Membranfraktion, l – lösliche Proteine, Ü – überexprimiertes *ycf1*-Stück, WT – Wildtypproteine (löslich), PD – lösliche Proteine einer *ycf1*PDA-Pflanze (siehe voriges Kapitel).

Die „Blots“ stammten von Laemmligelens mit 8 % PAA.

Das Serum der 7. Blutung wurde für nachfolgende Untersuchungen verwendet, weil es das deutlichste Signal lieferte (Abbildung 13-A). Beim Test mit verschiedenen Tabakgeweben zeigten einzig Keimlinge ein sehr schwaches Signal passend zur Größe von Ycf1. Ebenso wurde überprüft, ob Ycf1 in verschiedenen Streßsituationen verstärkt exprimiert wird. Eine Pflanze aus der Gewebekultur wurde unter UV-Licht gestellt, und es wurden in verschiedenen Abständen Proben entnommen, wobei die Pflanze schon nach 1,5 h komplett eingegangen war und schon nach einer Stunde kaum noch intakte Proteine vorhanden waren. Dafür ist auf Höhe von Ycf1 ein schwaches Signal zu erahnen (siehe Abbildung 14-E). Pflanzen, die zuvor bei 20 °C gewachsen waren, wurden Temperatursprüngen von 10 °C ausgesetzt, und es wurden in verschiedenen Abständen Proben entnommen. So war bei kälteadaptierten (7 Tage bei 10 °C) Pflanzen ein Signal auf Höhe von Ycf1 (220 kDa) zu beobachten (siehe Abbildung 14-H), das

nach Hitzeschock wieder verschwand (siehe Abbildung 14, I-K). Das deutlichste Signal jedoch tauchte nach 24 Stunden bei 30 °C auf (siehe Abbildung 14-L). Im Zuge der Temperaturanpassung verschwand es jedoch wieder (siehe Abbildung 14-M). Darauf folgender Kälteschock blieb ohne Effekt auf die Ycf1-Expression (siehe Abbildung 14, N-O).

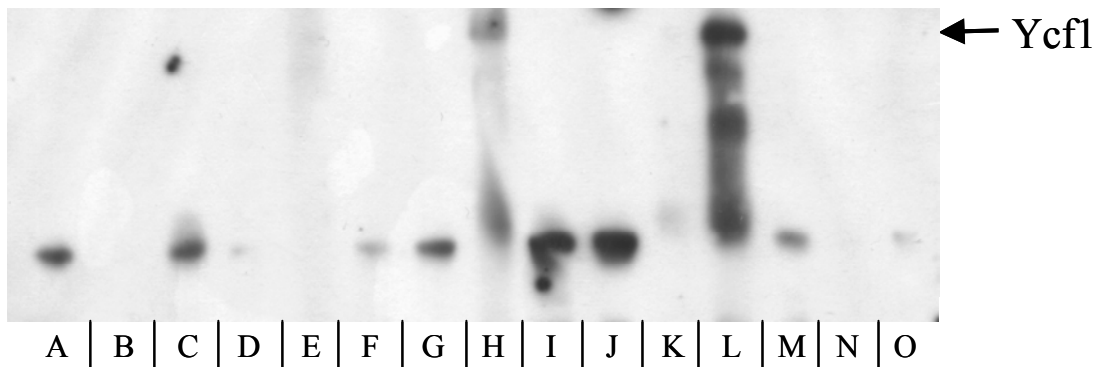


Abbildung 14: Westernanalyse gegen Ycf1 verschiedener Pflanzenproben

- A: WT, in Blaulicht.
- B: ycf1PDA-Pflanze (siehe voriges Kapitel), in Blaulicht.
- C: UV, t = 0.
- D: UV, t = 30 min.
- E: UV, t = 1 h.
- F: Pflanzen unterschiedlicher Temperaturbedingungen, t = 0.
- G: 10 °C, t = 24 h.
- H: 10 °C, t = 7 Tage.
- I: 10 °C → 30 °C, t = 90 min.
- J: 10 °C → 30 °C, t = 3 h.
- K: 10 °C → 30 °C, t = 24 h.
- L: 30 °C, t = 24 h.
- M: 30 °C, t = 7 Tage.
- N: 30 °C → 10 °C, t = 90 min.
- O: 30 °C → 10 °C, t = 24 h.

Der „Blot“ stammte von einem Laemmliigel mit 10 % PAA. Eine Exposition des Films für 25 min war nötig, um die gewünschten Fragmente sichtbar zu machen, was zu erhöhtem Hintergrund führte.

3.2 Untersuchungen zu *ycf14*

3.2.1 Inaktivierung von *ycf14*

Ycf14 (Positionen auf dem Tabakchromosom: 2.129-3.658, im Intron des *trnK*-Gens) gehört neben *ycf1* zu den wenigen offenen Leserastern des Plastidengenoms, bei denen die Funktion des Genprodukts noch unbekannt ist. Einige Hinweise sprechen aber dafür, daß es am Spleißen beteiligt sein könnte (diskutiert in Kapitel 4.2.1). Durch „knock-out“ des Gens sollte dies genauer untersucht werden. Dabei wurde die Annahme berücksichtigt, daß das Genprodukt möglicherweise auch am Spleißen anderer Introns beteiligt sein kann, nicht nur an demjenigen, in dem das Gen positioniert ist. Es wurde deshalb nicht, wie sonst bei Geninaktivierungen üblich, lediglich das betreffende Gen deletiert oder durch Insertion des Markergens unterbrochen, sondern das gesamte Intron entfernt. Sollte also die Funktion von MatK bzw. *Ycf14* einzig im Spleißen des *trnK*-Introns liegen, wären problemlos Transformanten zu erhalten. Ein erfolgreiches Einführen eines intronlosen tRNA-Gens ohne Funktionsbeeinträchtigung wurde bereits für das *trnI*-Gen in Tabak beschrieben (Mühlbauer *et al.* 2002).

Zunächst wurde ein „knock-out“-Vektor für die Chloroplastentransformation hergestellt (Abbildung 15): Aus dem Sal3-Klon der DNA-Bank von Tabak (Sugiura *et al.* 1986) wurde ein 679 Bp großes Stück von *psbA* bis *trnK* (Exon 2) mit *PvuII* und *XmaI* ausgeschnitten und in einen mit *HincII* und *XmaI* geöffneten pBS II KS-Vektor ligiert. Parallel dazu wurde ein zweites, 1.725 Bp großes Stück von *rps16* bis *trnK* (Exon 1) mit *BpiI* und, nach Glätten der Enden mit dem Klenowenzym, mit *SacI* aus dem Sal3-Klon ausgeschnitten und in das Konstrukt mit dem ersten „Insert“ eingefügt, indem der Vektor mit *XbaI* und, nach Glätten der Enden mit dem Klenowenzym, mit *SacI* geöffnet worden war. Dieser nun beide „Inserts“ enthaltende Vektor wurde zunächst mit *ScaI* partiell und dann mit *XmaI* geschnitten, um die mit den korrespondierenden Restriktionsenzymen behandelte *trnK*-cDNA (PCR-Produkt mit den „Primern“ K1 und K2) aufzunehmen. Damit war die cDNA-Situation an dieser Stelle nachgestellt worden, in der *trnK* ohne Intron (und damit auch ohne *ycf14*) vorliegt. Das entspricht dem Ausgangskonstrukt B der Abbildung 15. Die nächstgelegene mögliche Restriktionsschnittstelle wurde gewählt, um das Markergen *aadA* einzufügen. Dazu mußte das Ausgangskonstrukt B (siehe Abbildung 15) partiell mit *EcoRI* geschnitten und die mit *SacI* und *EcoRI* aus ihrem Vektor (pBS II SK+) entfernte *aadA*-Kassette mit Hilfe eines Adaptors eingefügt

werden (fertiges Konstrukt C, siehe Abbildung 15). Bei dem Adaptor handelte es sich um ein Oktamer (5'-AATTAGCT-3'), das in extrem hoher Konzentration (siehe Kapitel 2.5) in die Ligation eingesetzt wurde und die nichtkompatiblen Überhänge der *SacI*- und *EcoRI*-Schnittstellen verbinden sollte. Nach Kontrolle des fertigen Konstrukts (matKO) durch Sequenzierung wurde es in die Chloroplastentransformation eingesetzt.

Die Transformation von matKO mittels Partikelkanone (20 Blätter) erbrachte 27 potentielle Transformanden, wobei nur in den ersten 13 tatsächlich die Mutation nachgewiesen werden konnte (siehe Tabelle 6).

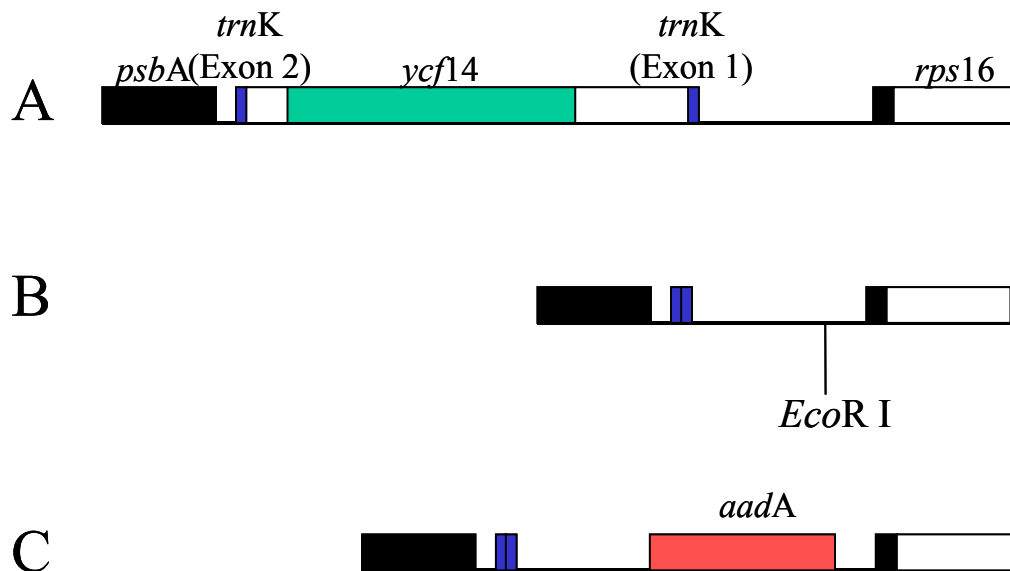


Abbildung 15: Konstruktion des *ycf14*-„knock-out“-Vektors (matKO)

A: Tabakwildtypplastiden-DNA der betreffenden Region.

B: zwei Stücke zwischen *psbA* und *rps16* wurden um *ycf14* ausgeschnitten und in einen Vektor ligiert, die beiden deletierten *trnK*-Exons wurden mit *trnK*-cDNA geflickt, so daß das *trnK*-Gen komplett, aber ohne Intron vorhanden war (siehe Text).

C: die nächste singuläre Schnittstelle (*EcoRI*) wurde aufgeschnitten und mit der *aadA*-Kassette gefüllt.

Bezeichnung	Aussehen	PCR	Southern
matKO-1, I	weiße Blättchen	-	-
matKO-2, III	Callus mit grünen Blättchen	+	(+)
matKO-3	hellgrüne Blättchen	-	-
matKO-4, III	grüne Blättchen	+	(+)
matKO-5, III	grüne Blättchen	+	-
matKO-6, III	hellgrüner Callus	+	-
matKO-7, I	hellgrüner Callus	-	-
matKO-8, III	hellgrüner Callus	+	-
matKO-9, I	grüne Blättchen	-	-
matKO-10, III	grüne Blättchen	+	-
matKO-11, III	hellgrüne Blättchen	+	-
matKO-12, IV	hellgrüne Blättchen	+	+
matKO-13, III	grüner Callus	+	+
matKO-14, III	grüne Blättchen	+	-
matKO-15	hellgrünes Pflänzchen	-	-
matKO-16	hellgrüne Blättchen	-	-
matKO-17	hellgrüner Callus	-	-
matKO-18	hellgrüner Callus	-	-
matKO-19	hellgrüner Callus	-	-
matKO-20	hellgrüne Blättchen	-	-
matKO-21	hellgrüner Callus	-	-
matKO-22	hellgrüne Blättchen	-	-
matKO-23	hellgrüne Blättchen	-	-
matKO-24	hellgrüner Callus	-	-
matKO-25	hellgrüne Blättchen	-	-
matKO-26	hellgrüner Callus	-	-
matKO-27	hellgrüner Callus	-	-

Tabelle 6: Liste der potentiellen Transformanden nach Transformation mit matKO

Römische Zahlen hinter den Bezeichnungen der potentiellen Transformanden benennen die höchste Regenerationsrunde, in der Blattstückchen für die aufgeführten Untersuchungen entnommen wurden

Nach Identifizierung durch PCR mit *aadA*-spezifischen „Primern“ (*aadAli59* und *aadAre60*) wurden die Transformanden durch RFLP-Analysen überprüft. Wie in Abbildung 16 verdeutlicht, beträgt die für das Wildtypgenom nach Restriktion mit *HindIII* erwartete Fragmentlänge mit einer *psbA*-spezifischen Sonde 5.904 Bp und für transformierte Genomkopien 3.442 Bp. Nur vier der resistenten Linien zeigten überhaupt den Einbau des „knock-out“-Konstrukts (matKO-2/4/12/13, siehe Abbildung 17), wenn auch meist schwach. Die gezeigten „Southern Blots“ zeigen in jeder Spur (auch) die Wildtypgröße, was bedeutet, daß es in keinem Fall homoplastomische Linien gegeben hat. Lediglich bei einer einzelnen Linie (matKO-12, siehe

Abbildung 17-A) war das gewünschte Fragment deutlich zu erkennen, die aber in weiteren Regenerationsrunden nicht nur nicht stärker wurde, sondern schließlich ganz verloren ging (siehe Abbildung 17-B).

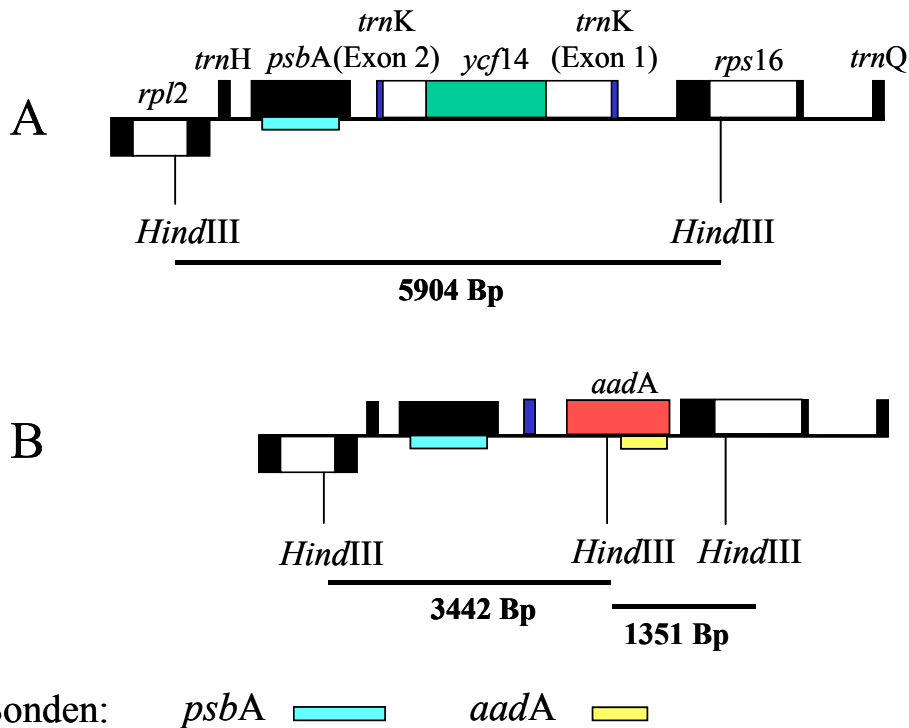


Abbildung 16: Erläuterung der Fragmentgrößen der matKO-RFLP-Analyse

A: erwartete Größe des Wildtypgenoms nach Restriktion mit *Hind*III und Hybridisierung mit einer *psbA*-spezifischen Sonde.

B: erwartete Größen der *ycf14*-„knock-out“-Genomkopien nach Restriktion mit *Hind*III und Hybridisierung mit einer *psbA*-spezifischen und einer *aadA*-spezifischen Sonde.

Da aber mittels PCR die *aadA*-Kassette in vielen Linien nachgewiesen werden konnte, wurden die „Southern Blots“ im folgenden mit zwei Sonden hybridisiert: Mit der bisher verwendeten *psbA*-Sonde und zusätzlich mit einer *aadA*-Sonde. Wie aus Abbildung 16 ersichtlich, ist mit letzterer ein Signal bei 1.351 Bp zu erwarten. Der „Southern Blot“ B (Abbildung 17) zeigt nun, daß alle Spuren bis auf die erste, die Wildtyp-DNA enthält, dieses Fragment aufweisen. Das obere Fragment in der ersten Spur stellt sich kleiner dar als in den übrigen Spuren.

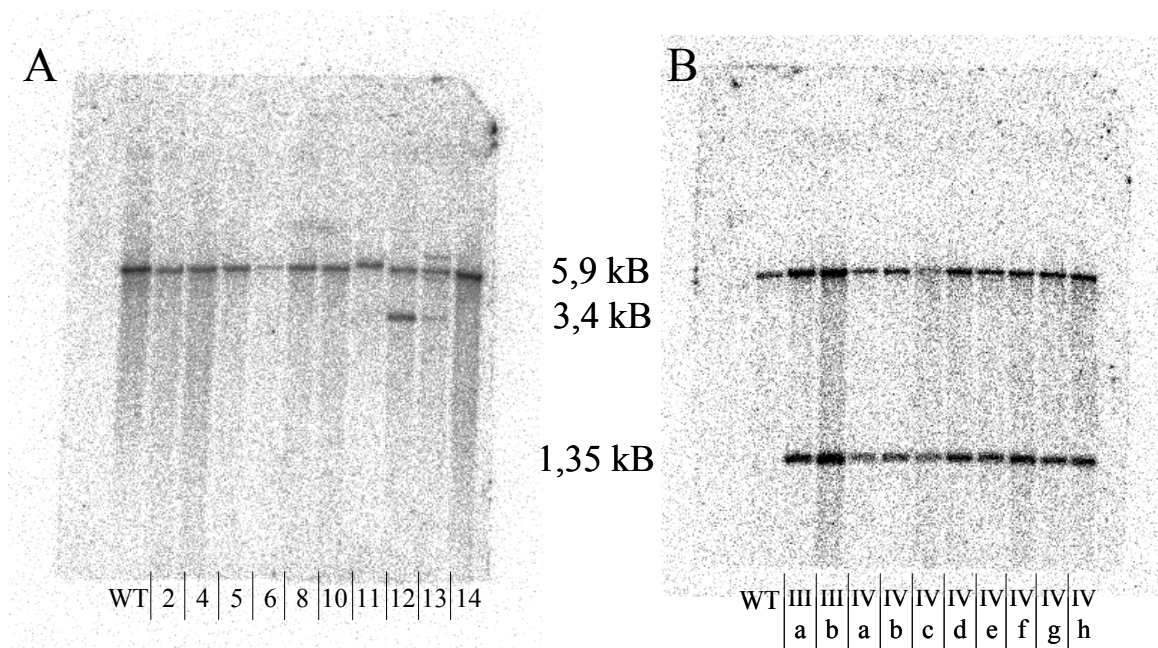


Abbildung 17: Southernanalyse der matKO-Transformanden

Die erste Spur (WT) der beiden gezeigten „Southern Blots“ enthält jeweils Wildtyp-DNA.

A: die weiteren Spuren enthalten DNA verschiedener Linien potentieller Transformanden in der 3. Regenerationsrunde (siehe Tabelle 6), wobei nur mit einer *psbA*-spezifischen Sonde hybridisiert wurde.

B: die weiteren Spuren enthalten verschiedene Proben der Transformante mKO-12 (römische Zahlen bezeichnen die Regenerationsrunde), hier wurde gleichzeitig mit einer *psbA*-spezifischen und einer *aadA*-spezifischen Sonde hybridisiert. Eine Erläuterung der Fragmentgrößen zeigt Abbildung 16.

Das Modell in Abbildung 18 kann dies erklären: Die errechnete Fragmentgröße für ein Produkt, welches durch Rekombination zwischen dem *trnK*-Gen und der *aadA*-Kassette entsteht, be-trägt 5.969 Bp, nur 65 Bp größer als das Wildtypfragment. Bei einem Abstand von 687 Bp zwischen *trnK* und *aadA*-Kassette, ist dieses Ereignis wahrscheinlich. Auf die *aadA*-Kassette kann auf selektivem Medium nicht verzichtet werden. Da aber offenbar auch das *ycf14*-Gen nicht so ohne weiteres verloren gehen kann, ergibt sich diese Situation, die den „knock-out“ verhindert, ohne auf die Spectinomycinresistenz zu verzichten.

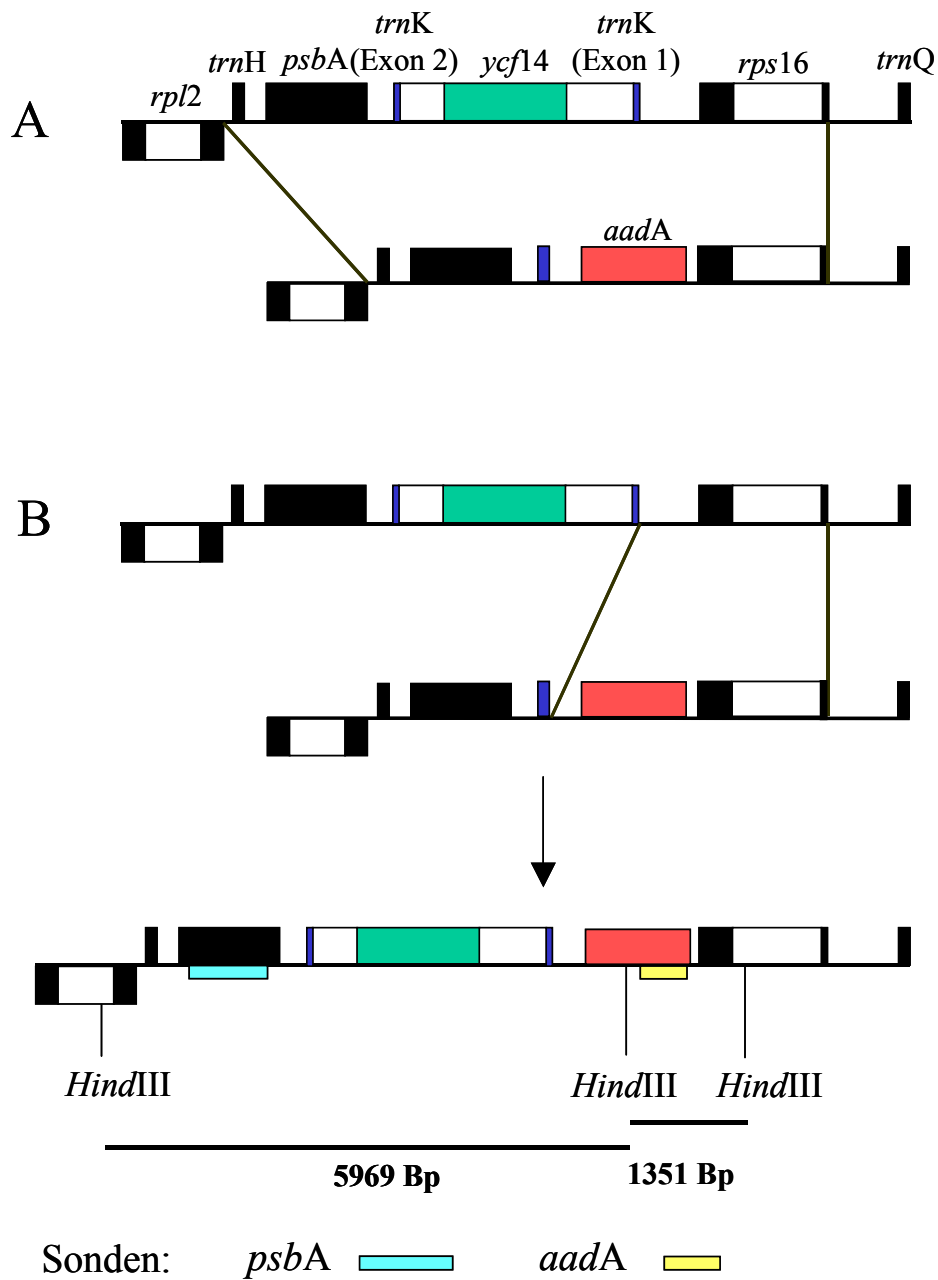


Abbildung 18: Rekombinationsmöglichkeiten nach *matKO*-Transformation

A: Rekombination in den Randbezirken des Konstrukts, die den „knock-out“ von *ycf14* zur Folge hat.

B: Rekombination zwischen *trnK* und *aadA*, was die unterhalb des Pfeils gezeigte Situation zur Folge hat: die Genomkopie enthält sowohl das *trnK*-Intron als auch die *aadA*-Kassette. Zusätzlich werden Restriktionsschnittstellen von *Hind*III und die erwarteten Fragmentgrößen bei einer RFLP-Analyse mit den eingezeichneten Sonden gezeigt.

3.2.2 Modifizierter Inaktivierungsansatz

Um eine Rekombination zwischen *trnK* und *aadA*-Kassette zu unterbinden, wurde ein modifiziertes „knock-out“-Konstrukt ersonnen, in dem mittels PCR ein 13 Bp großes Stück des *trnK*-Exons 2 (mit den „Primern“ M13rev und *trnK*+16S von pBSaadA+, dem die *aadA*-Kassette enthaltenden Bluescriptvektor) mit nur 6 Bp Abstand vor die *aadA*-Kassette gehängt wurde (Abbildung 19). Zur Prozessierung der tRNA genügt dies, da die 3'-Endonuklease offenbar die Sekundärstruktur der tRNA erkennt und eine Base vor dem Ende der tRNA schneidet (Mörl & Marchfelder 2001). Dies geschieht immer nach der 74. Base, unabhängig von der Sequenzumgebung (Oommen *et al.* 1992). Der Primer *trnK*+16S bindet die 16S-Promotorregion des *aadA*-Gens der *aadA*-Kassette und hat einen Überhang, der den Teil des *trnK*-Exons 2 mit der *Xma*I-Schnittstelle enthält, in die im vorherigen Konstrukt das *trnK*-cDNA-PCR-Produkt eingefügt worden war (siehe Beschreibung zur Abbildung 15). Hier konnte nun die *aadA*-Kassette in unmittelbare Nachbarschaft zum Ort des Geschehens gebracht werden und nicht mehr getrennt rekombinieren. Mit dem Restriktionsenzym *Xma*I wurde das Konstrukt B (siehe Abbildung 15) mit dem intronlosen *trnK*-Gen innerhalb des Exons 2 von *trnK* und das PCR-Produkt (das vorher zur Vermehrung und Erleichterung der Restriktion in einen TA-Vektor kloniert worden war) geschnitten, wobei Konstrukt B danach noch dephosphoryliert wurde. Mittels Ligation konnte schließlich die *aadA*-Kassette im direkten Anschluß (nur 6 Bp Abstand) an das intronlose *trnK*-Gen plaziert werden (siehe Abbildung 19). Nach Kontrolle des fertigen Konstrukts (matK_{Om}) durch Sequenzierung wurde es in die Chloroplastentransformation eingesetzt.

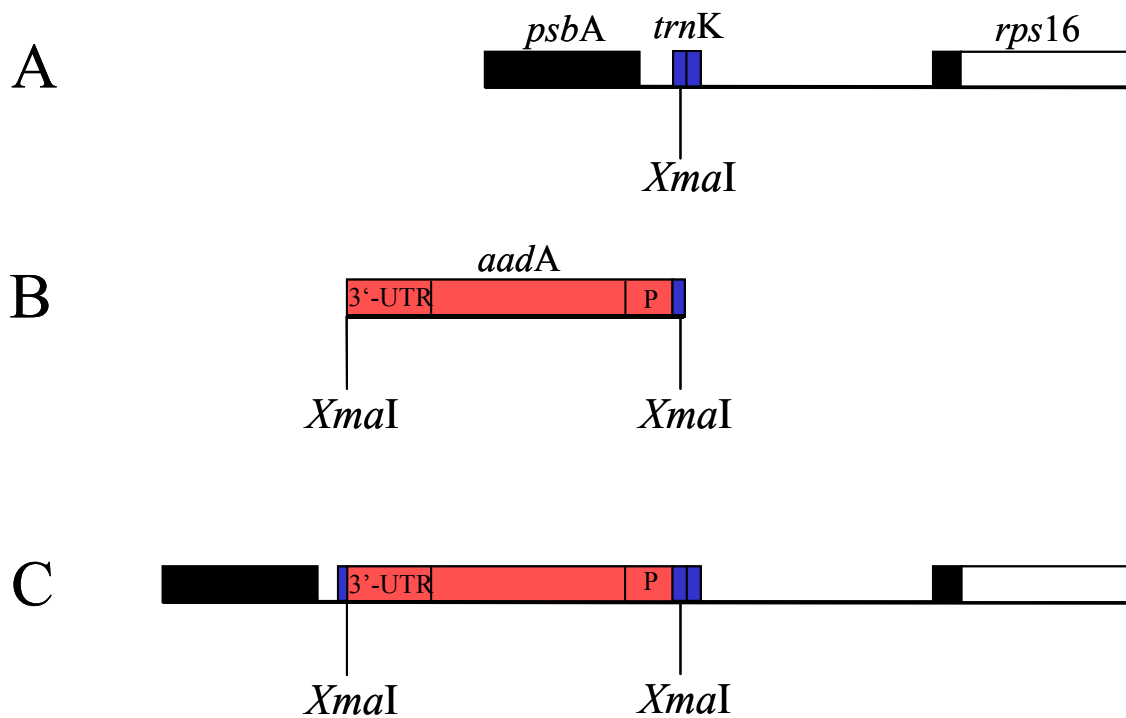


Abbildung 19: Konstruktion eines modifizierten Inserts für den *ycf14*-„knock-out“ (matK0m)

A: Ausgangskonstrukt ohne *trnK*-Intron (siehe Abbildung 15-B).

B: Verknüpfung der *aadA*-Kassette mit *trnK* durch PCR (siehe Text).

C: Insertion der *aadA*-Kassette in die *Xma*I-Schnittstelle hinter dem kompletten *trnK*-Gen.

3'-UTR bezeichnet die 3'-regulatorische Region, P den Promotor der *aadA*-Kassette.

Nach Transformation mit dem matK0m-Vektor konnten zunächst keine Transformanten erhalten werden, so daß dies wiederholt wurde. Nach erneuter Transformation gab es zumindest PCR-Signale mit *aadA*-spezifischen „Primern“ (*aadAli59* und *aadAre60*, siehe Abbildung 20), jedoch nur einen extrem schwachen Nachweis auf Southernebene (siehe Abbildung 22).

<i>Bezeichnung</i>	<i>Aussehen</i>	<i>PCR</i>	<i>Southern</i>
matK _{Om} 2-1	grüne Pflänzchen	-	(+)
matK _{Om} 2-2, I	grünes Pflänzchen	-	(+)
matK _{Om} 2-3, I	grüner Callus	(+)	(+)
matK _{Om} 2-4, II	grüner Callus	+	(+)
matK _{Om} 2-5	hellgrüner Callus, verblaßt	-	-
matK _{Om} 2-6, I	kleiner hellgrüner Callus	-	(+)
matK _{Om} 2-7, II	kleiner grüner Callus	+	(+)
matK _{Om} 2-8, I	hellgrüner Callus	-	(+)
matK _{Om} 2-9	grüner Callus	-	-
matK _{Om} 2-10	kleiner hellgrüner Callus	-	-
matK _{Om} 2-11	heller Callus	-	-

Tabelle 7: Liste der potentiellen Transformanden nach wiederholter Transformation mit matK_{Om}

(siehe Abbildung 19)

‡ bezeichnet abgestorbene Linien, (+) ein nur schwaches Signal, römische Zahlen hinter den Bezeichnungen der potentiellen Transformanden benennen die höchste Regenerationsrunde, in der Blattstückchen für die aufgeführten Untersuchungen entnommen wurden.

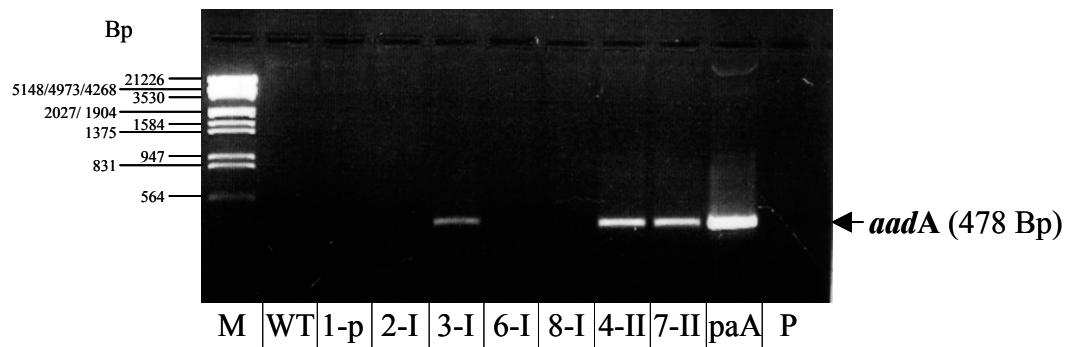


Abbildung 20: PCR von matK_{Om}-Transformanden

PCR einiger potentieller matK_{Om}-Transformanden (siehe

Tabelle 7) mit den *aadA*-spezifischen „Primern“ *aadAli59* und *aadAre60* (Produktgröße 478 Bp).

M: Marker, WT: Wildtyp, p: Primärpflanze, römische Zahlen hinter den Bezeichnungen der potentiellen Transformanden benennen die Regenerationsrunde, paA: *aadA*-Kassette-haltiger Vektor als Positivkontrolle, P: Pufferkontrolle.

Nach Restriktion mit *Hind*III wurde für Wildtypplastomkopien wie auch schon beim mKO-Konstrukt mit *psbA*-spezifischer Sonde eine Fragmentlänge von 5.904 Bp erwartet. Transformierte Genomkopien sollten dagegen ein Fragment von 2.830 Bp Länge mit *psbA*-spezifischer Sonde und ein Fragment von 1.955 Bp Länge mit *aadA*-spezifischer Sonde erbringen (siehe Abbildung 21).

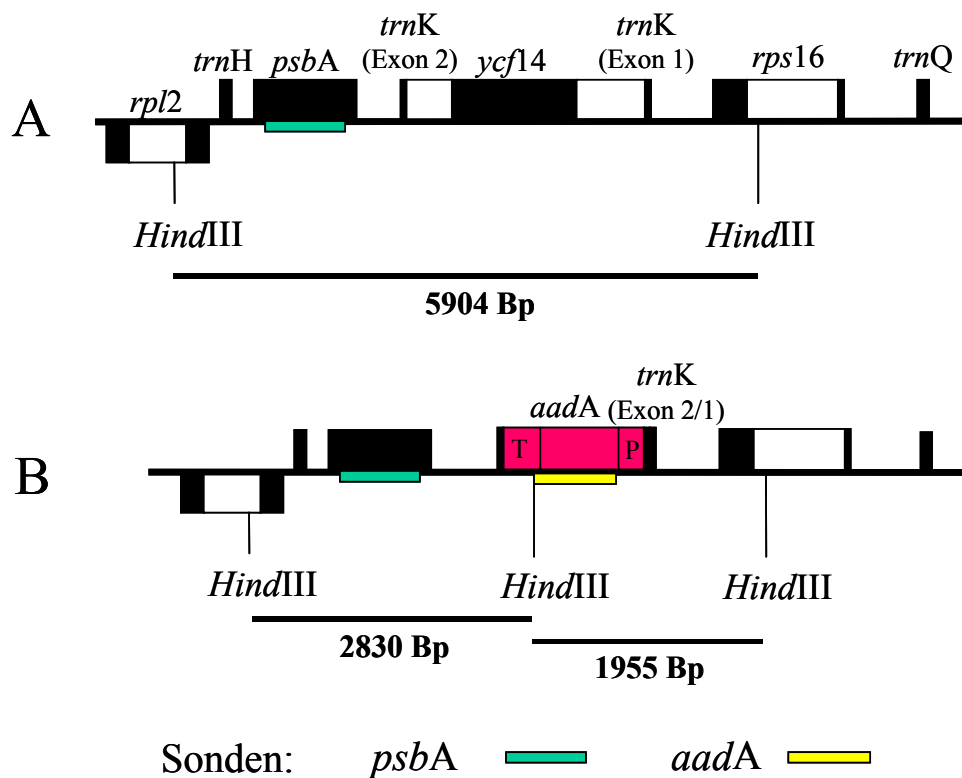


Abbildung 21: Erläuterung der Fragmentgrößen der matKOM-RFLP-Analyse

A: erwartete Größe des Wildtypgenoms nach Restriktion mit *Hind*III und Hybridisierung mit der eingezeichneten *psbA*-Sonde.

B: erwartete Größe der *ycf14*-„knock-out“-Genomkopien.

T bezeichnet den Terminator (bzw. die 5'-UTR), P den Promotor der *aadA*-Kassette.

Zunächst konnte nach Hybridisierung des „Southern Blots“ der potentiellen Transformanden mit *psbA*-spezifischer Sonde nur das Wildtypfragment von 5.904 Bp Länge beobachtet werden (siehe Abbildung 22–A). Erst nach längerer Exposition (2 Tage) konnte in einigen Fällen ein schwaches Signal auf Höhe des gewünschten Fragments der Transformanden von 2.830 Bp ausgemacht werden (siehe Abbildung 22-B). In weiteren Generationsrunden wurde es nicht wieder gefunden. Es scheinen sich daher nur wenige Kopien des transformierten Genoms erhalten zu haben, offenbar gerade ausreichend, um die Spectinomycinresistenz aufrecht zu erhalten. Ein *ycf14*-„knock-out“ scheint daher auch auf diese Weise nicht möglich zu sein.

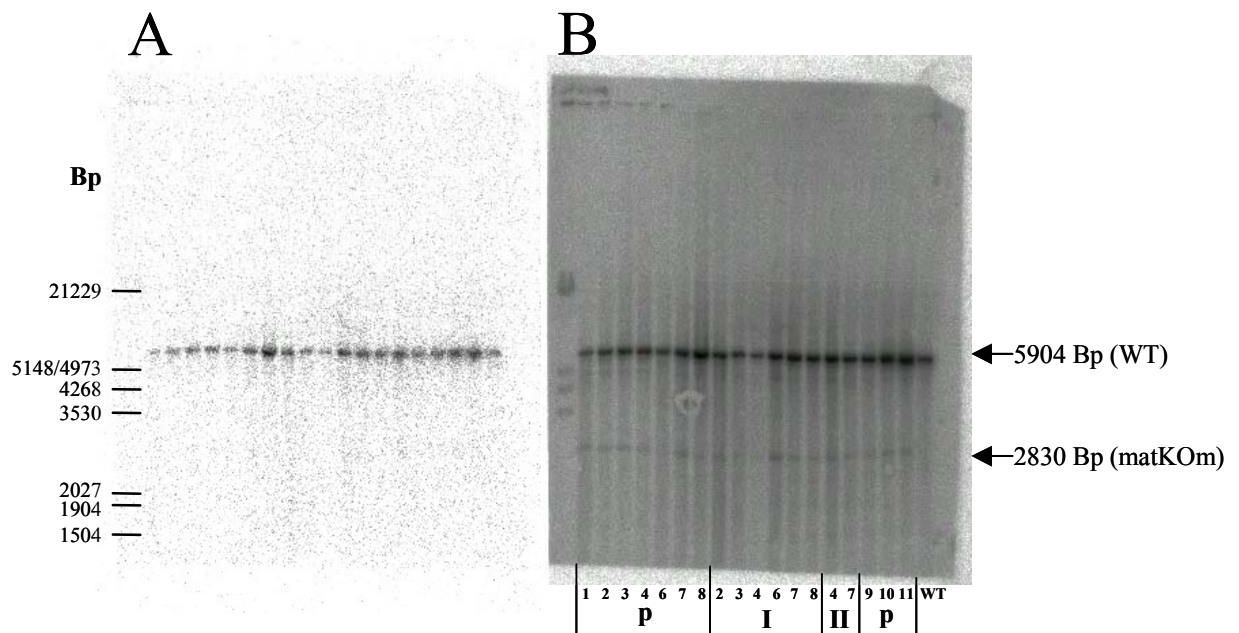


Abbildung 22: Southernanalyse der *matK Om*-Transformanden

A: „Southern Blot“ mit verschiedenen potentiellen Transformanden (siehe Tabelle 7) nach Hybridisierung mit einer *psbA*-spezifischen Sonde.

B: die selbe Blotmembran nach längerer Exposition.

p-Primärspöß, römische Zahlen bezeichnen die Regenerationsrunde, in der sich das untersuchte Material befand.

3.3 Untersuchungen zur RNA-Edierung

3.3.1 Phylogenie einer Edierungsstelle im *ndhG*-„Leader“

Die *ndh*-Gene der Plastiden und ihrer Vorläufer kodieren für Untereinheiten eines Komplexes in den Thylakoidmembranen, der homolog zur mitochondrialen NADH-Dehydrogenase ist (Casano *et al.* 2000). In Cyanobakterien findet man sieben Operons mit *ndh*-Genen (Kaneko *et al.* 1996). Im Lauf der Plastidenevolution wurden drei dieser Operons bei den meisten Arten zu einer Transkriptionseinheit verbunden: *ndhHAIGE-psaC-ndhD* (Matsubayashi *et al.* 1987, Del Campo *et al.* 2000 und 2002, Legen *et al.* 2001). Es wurde in Mais neben einer Reihe intragenischer Edierungsstellen auch eine 10 Nukleotide vor dem *ndhG*-Gen entdeckt (siehe Abbildung 24), bei der wie in Plastiden die Regel ein Cytidin in ein Uridin verändert wurde. Im folgenden wird die Erforschung der Phylogenie dieser Edierungsstelle dargestellt.

Blattmaterial 27 verschiedener Vertreter möglichst vieler verschiedener Monokotyledonenordnungen (7 von 10, nach APG 1998, siehe Tabelle 8) wurde in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Zunächst wurde DNA isoliert und mit den „Primern“ RMndhI und RMndhG in eine PCR-Reaktion eingesetzt. Das Produkt wurde dann mit dem „Primer“ ng2 sequenziert. Wurde an der betreffenden Stelle 10 Nukleotide vor dem Start des *ndhG*-Gens, an der in Mais die Edierungsstelle entdeckt worden war (siehe Abbildung 23), ein Cytidin gefunden, wurde aus dem gleichen Blattmaterial RNA isoliert und dieses in cDNA umgeschrieben. Durch Vergleich mit der DNA-Sequenz konnte überprüft werden, ob die entsprechende Stelle in der getesteten Art ediert wird oder nicht. Wurde an der Stelle ein Thymidin gelesen, was in den meisten Arten der Fall war, konnte davon ausgegangen werden, daß die Sequenz schon „präediert“ vorlag.

Art	Ordnung
<i>Allium cepa</i> (Zwiebel)	Asparagales
<i>Avena sativa</i> (Hafer)	Poales
<i>Canna indica</i> Hybride „Felix Ragout“ (Indisches Blumenrohr)	Zingiberales
<i>Chlorophytum comosum</i> (Grünlilie)	Liliales
<i>Dicranopygium microcephalum</i>	Pandanales
<i>Eleusine coracana</i> (Fingerhirse)	Poales
<i>Eragrostis tef</i>	Poales
<i>Eriocaulon fenestratum</i>	Poales
<i>Flagellaria indica</i>	Poales
<i>Hanguana malayana</i>	Commelinales
<i>Hordeum vulgare</i> (Gerste)	Poales
<i>Hydrocharis morus-ranae</i> (Froschbiß)	Alismatales
<i>Iris germanica</i> var. <i>germanica</i> Barbata-Elator-Gruppe „Mohr Lemonade“ (Schwertlilie)	Asparagales
<i>Joinvillea ascendens</i> var. <i>glabra</i>	Poales
<i>Juncus inflexus</i> (Binse)	Poales
<i>Narcissus pseudonarcissus</i>	Asparagales
<i>Oncidium ansiferum</i>	Asparagales
<i>Oryza sativa</i> (Reis)	Poales
<i>Saccharum officinarum</i> (Zuckerrohr)	Poales
<i>Secale cereale</i> (Roggen)	Poales
<i>Sorghum bicolor</i> (Hirse)	Poales
<i>Tradescantia ohiensis</i> (Dreimasterblume)	Commelinales
<i>Tripsacum dactyloides</i> var. <i>hispidum</i>	Poales
× <i>Triticosecale</i> Wittmack	Poales
<i>Triticum aestivum</i> (Weizen)	Poales
<i>Typha angustifolia</i> (Rohrkolben)	Poales
<i>Zea mays</i> (Mais)	Poales

Tabelle 8: Liste der 27 untersuchten Pflanzenarten

Die rechte Spalte zeigt ihre phylogenetische Zuordnung (nach APG 1998).

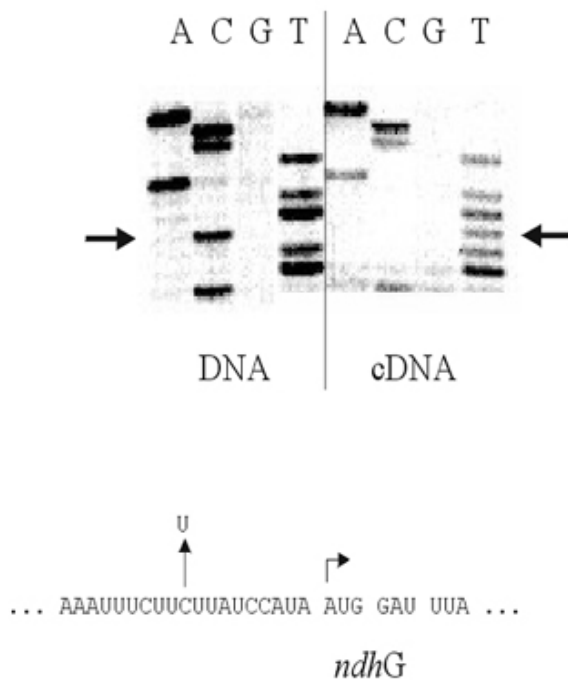


Abbildung 23: Sequenzbeispiel der *ndhG*-5'-Region

Oben links ist ein Ausschnitt eines Sequenzgels von DNA, rechts von cDNA aus Mais gezeigt. Die Edierungsstelle, an der sich im Fall von DNA ein C(ytidin) befindet und in der cDNA ein T(hymidin) ist mit Pfeilen gekennzeichnet.

Darunter ist die ausgeschriebene Sequenz zu sehen, in der neben der Edierungsstelle (C→U) auch der Beginn des *ndhG*-Gens (AUG) mit einem Pfeil markiert ist.

Unter den Gräsern wurden folgende Arten als potentielle Edierer (d.h. mit Cytosin an betreffender Stelle) identifiziert: *Eleusine coracana* (Fingerhirse), *Oryza sativa* (Reis), *Saccharum officinarum* (Zuckerrohr), *Sorghum bicolor* (Hirse), *Tripsacum dactyloides* und *Zea mays* (Mais). Bei den meisten dieser Arten wurde auch erwartungsgemäß Edierung der betreffenden Stelle gefunden. Einzig bei *Sorghum bicolor* wird die Position nicht ediert, wobei diese Art auch an anderer Stelle aus dem sonst zwischen den Spezies hochkonservierten Bereich herausfällt. Um sicher zu gehen, daß bei der *Sorghum bicolor*-cDNA keine DNA-Kontaminationen vorlagen, wurden damit noch andere Edierungsstellen getestet, die sich der Erwartung entsprechend verhielten. Man muß also davon ausgehen, daß *Sorghum bicolor* in diesem Punkt von den anderen Gräsern abweicht. Ein ähnlicher Fall ist eine Edierungsstelle im *rpoB*-Gen, die in Gerste nicht ediert wird, sonst aber in allen anderen getesteten Arten (Zeltz *et al.* 1993). Hier wird angenommen, daß dies durch kompensatorische

Mutationen im *cis*-Bereich tolerierbar wird, was für *Sorghum bicolor* ebenfalls der Fall sein könnte. Üblicherweise befinden sich Edierungsstellen an für den Organismus wichtigen Punkten (Maier *et al.* 1996).

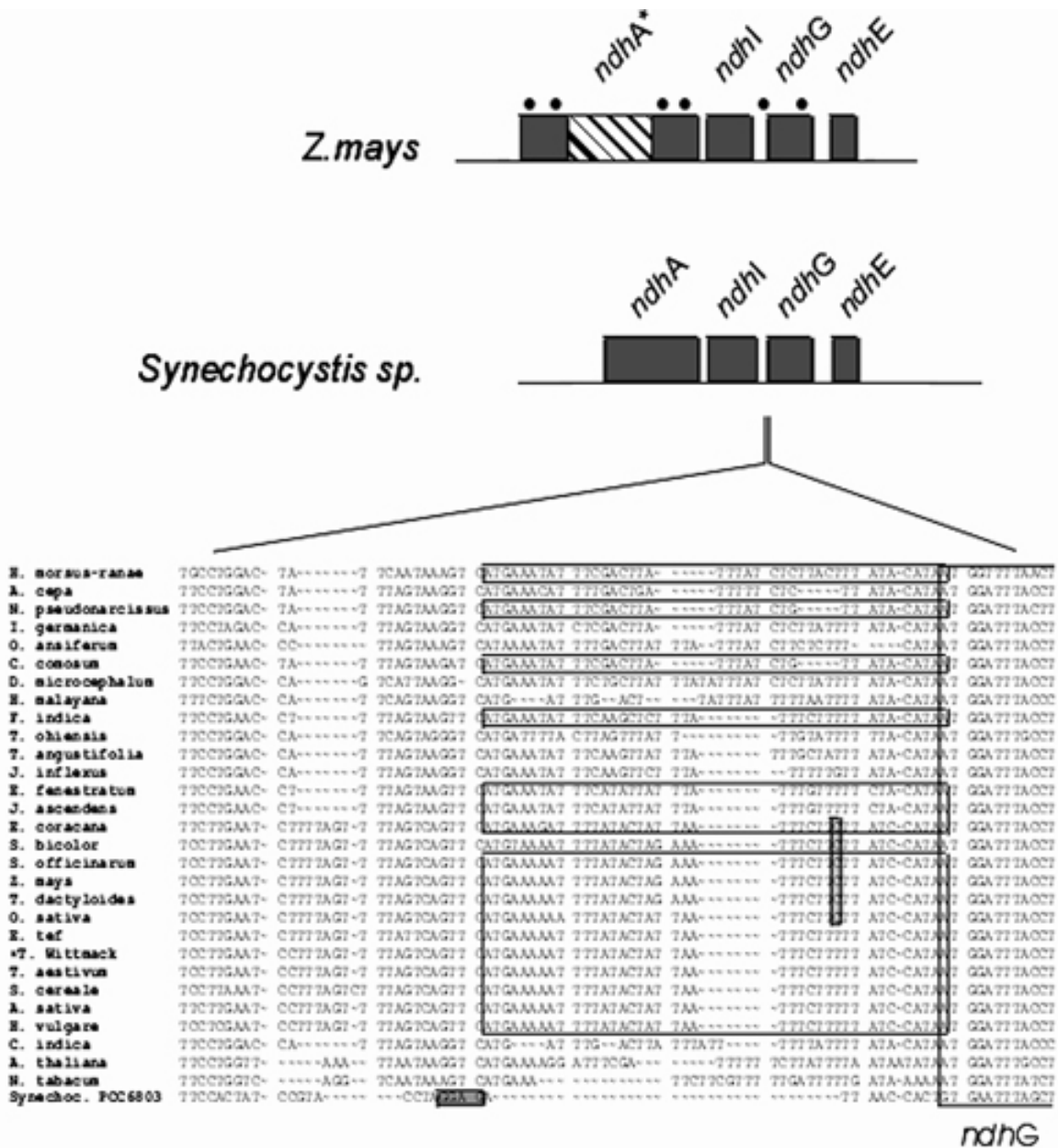


Abbildung 24: Sequenzvergleich der *ndhG*-„Leader“ verschiedener Spezies

Über dem „Alignment“ ist das *ndhG*-Operon von Mais und *Synechocystis* zu sehen, um anzuzeigen, wo sich der Sequenzausschnitt befindet. Der Stern markiert ein intronhaltiges Gen, die Punkte Edierungsstellen. Im „Alignment“ der Sequenzen (ab 100 Bp vor dem *ndhG*-Start) von 27 verschiedenen Spezies (Tabelle 8) ist die Edierungsstelle (falls vorhanden) eingerahmt. Ebenso wurde das *ndhG*-Gen und ein potentiell kurzes Leseraster (siehe Abbildung 27) hervorgehoben. Die Shine-Dalgarno-Sequenz wurde in *Synechocystis* grau eingekästelt.

Neben der Edierungsstelle, die Hauptaugenmerk dieser Untersuchung war, fiel auf, wie hochkonserviert die Sequenz, die aus der (cyano-)bakteriellen Shine-Dalgarno-Sequenz abgeleitet werden kann, zwischen den unterschiedlichen Spezies ist (siehe Abbildung 24), worauf in Kapitel 4.2.2 noch näher eingegangen werden soll. Allgemein ist bemerkenswert, daß sich der intergenische Bereich zwischen *ndhI* und *ndhG* im Vergleich zu den Cyanobakterien im Lauf der Plastidenevolution immens vergrößert hat, so daß eine Reihe neuer regulatorischer Sequenzbereiche zusätzlich zur Shine-Dalgarno-Sequenz denkbar erscheinen.

Desweiteren sollte untersucht werden, wann die beobachtete Edierungsstelle im Laufe der Evolution entstanden sein könnte. Hierzu wurden die in Abbildung 24 gezeigten Sequenzen in die Berechnung eines Stammbaumes, basierend auf einer „Maximum Parsimony“-Analyse (Holger Hupfer, Details siehe Drescher *et al.* 2002), einbezogen. Den damit abgeleiteten wahrscheinlichsten Stammbaum zeigen Abbildung 25 und Abbildung 26. Aus dem Stammbaumdetail, welches die Gräser hervorhebt (siehe Abbildung 26), wird ersichtlich, daß sich die Edierungsstelle auf dem Weg zum Mais auf einer recht späten Stufe entwickelt hat: Nachdem sich bereits einige Poaceaenspezies phylogenetisch trennten. So kann man die untersuchten Gräser in zwei Gruppen einteilen: Ein Zweig, der zu den Panicoidae (hier *Saccharum officinarum*, *Sorghum bicolor*, *Tripsacum dactyloides* und *Zea mays*), Bambusoidae sensu lato (hier *Oryza sativa*) und Chloridoidae (hier *Eleusine coracana* und *Eragrostis tef*) führte und ein zweiter, der zu den Pooidae (hier *Avena sativa*, *Hordeum vulgare*, *Secale cereale*, *×Triticosecale* Wittmack und *Triticum aestivum*) führte (siehe Aufgabelung). Unter den Arten, die sich nach Einführung der Mutation vom Thymidin zu Cytidin von der anderen Gruppe, bei der das Thymidin nicht mutierte, trennten, sind zwei „Nicht-edierer“ zu finden: *Sorghum bicolor*, das sein Cytidin nicht ediert, und *Eragrostis tef*, bei dem eine Rückmutation zum Thymidin stattfand. Denkbar wäre alternativ, daß die Edierungsstelle schon zu Beginn der Gräserentwicklung auftrat und im Vorläufer der Pooidae oder jedem einzelnen Vertreter dieser Gruppe und in *Eragrostis tef* unabhängig voneinander verloren ging, und zusätzlich bei *Sorghum bicolor* die Fähigkeit zur Edierung der Stelle. Das scheint aber um einiges unwahrscheinlicher zu sein.

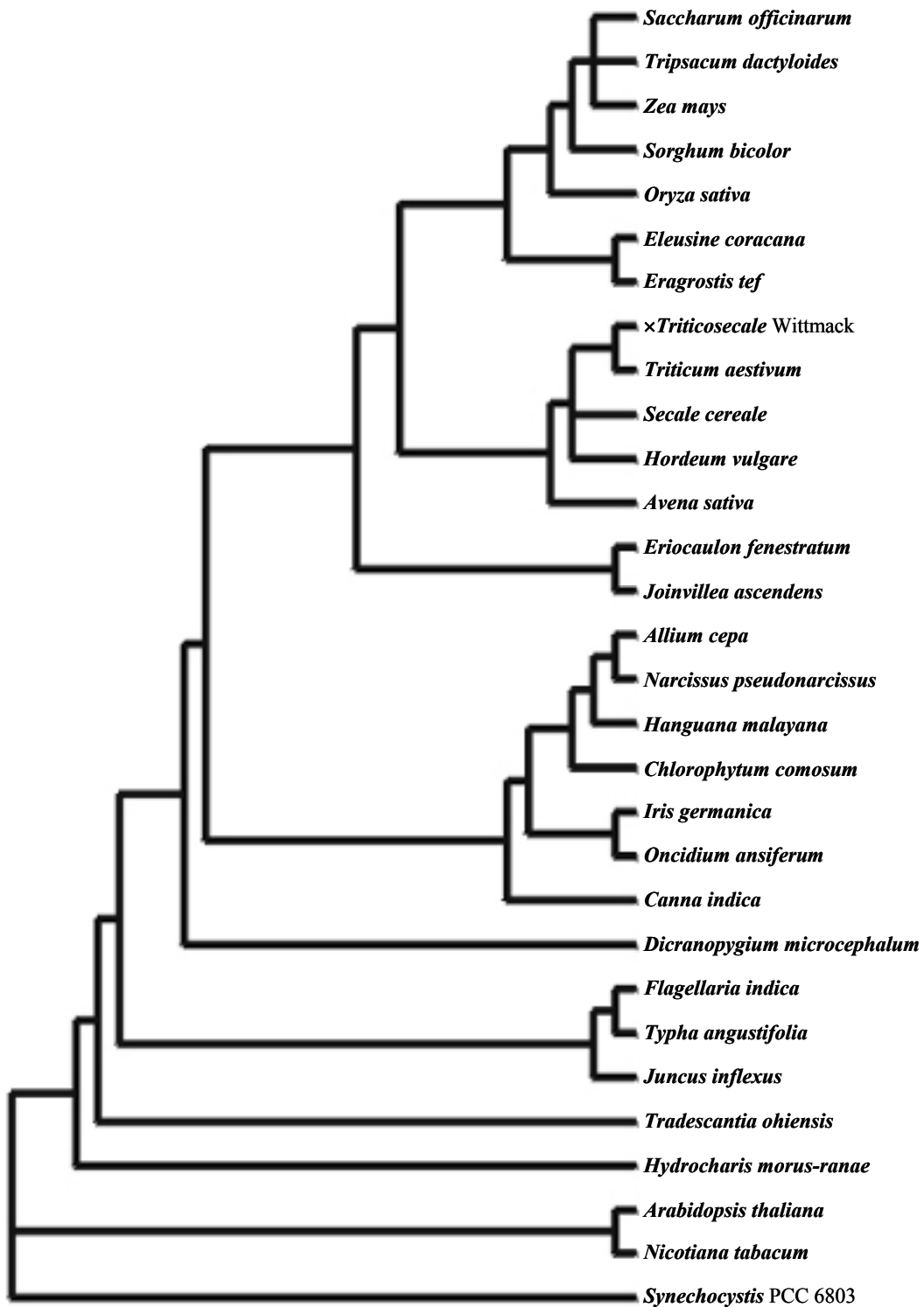


Abbildung 25: Stammbaum der untersuchten Arten

Der Stammbaum wurde aus den in Abbildung 24 gezeigten Sequenzen errechnet. Zu den im Laufe der Arbeit sequenzierten Arten wurden *Arabidopsis*, Tabak und *Synechocystis* als „Outgroups“ hinzugefügt.

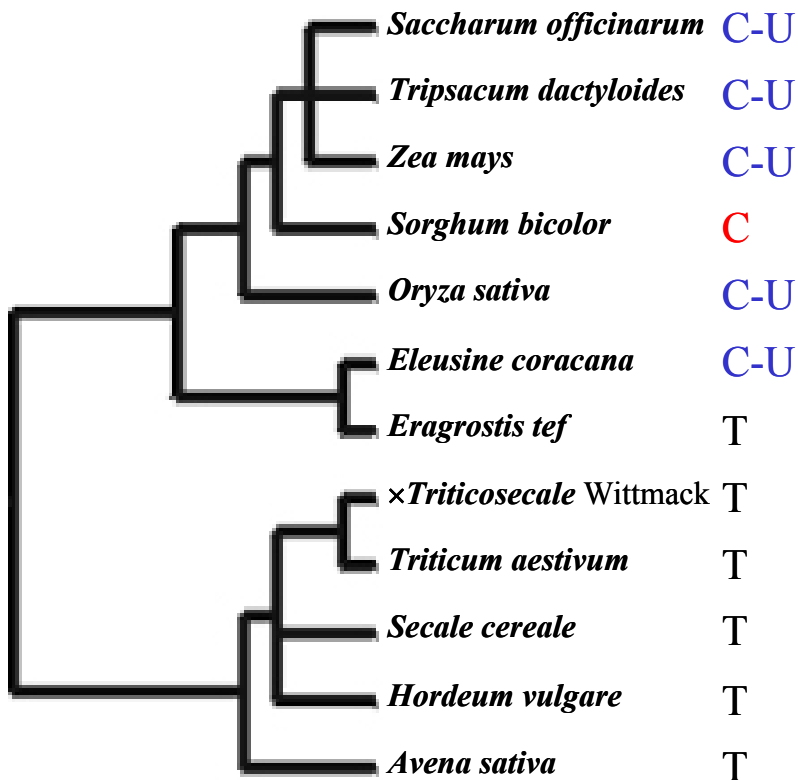


Abbildung 26: Stammbaumausschnitt der Gräser

T kennzeichnet Arten, bei denen sich an der betreffenden Stelle bereits ein Thymin befindet. Bei Arten mit einem C befindet sich dort ein Cytidin, was in den Fällen C-U in ein Uridin ediert wird.

Beim Sequenzvergleich fiel weiter auf, daß die konservierte Sequenz bei den Gräsern unmittelbar vor dem *ndhG*-Gen, für ein kurzes Peptid (PEP12) kodieren könnte (siehe Abbildung 27 und Diskussion Kapitel 4.2.2). Um die Existenz des Peptids zu überprüfen, wurde schon im Vorfeld zur vorliegenden Arbeit PEP12 sowohl C- als auch N-terminal an BSA gekoppelt und zur Gewinnung von Antiserum eingesetzt. Mit diesem zur Verfügung gestellten Antiserum wurde nun im Zuge dieser Arbeit mit einer Reihe von Westernanalysen versucht, das Peptid *in vivo* nachzuweisen. Wie in Abbildung 28-a zu erkennen ist, reagiert das Antiserum in einem Slot Blot-Ansatz mit einer PEP12-Probe und schwächer auch mit BSA. Auch bei einem Standard-„Western Blot“ ist mit PEP12 ein deutliches Signal zu erkennen, allerdings war ein solches Fragment in keinem Fall in den unterschiedlichen Proben mit Blattmaterialien zu finden (siehe Abbildung 28-b).



b

<i>Flagellaria indica</i>	MKYFKLFISFYT*
<i>Eriocaulon fenestratum</i>	MKYF I LFICFST*
<i>Joinvillea ascendens</i>	MKYF I LFICFST*
<i>Eleusine coracana</i>	MKDF I LLISFYP*
<i>Sorghum bicolor</i>	M*NF I LEISSYP*
<i>Saccharum officinarum</i>	MKNF I LEISFYP*
<i>Zea mays</i>	MKNF I LEISFYP*
<i>Tripsacum dactyloides</i>	MKNF I LEISFYP*
<i>Oryza sativa</i>	MKKF I LLISFYP*
<i>Eragrostis tef</i>	MKNF I LLISFYP*
× <i>Triticosecale</i> Wittmack	MKNF I LLISFYP*
<i>Triticum aestivum</i>	MKNF I LLISFYP*
<i>Secale cereale</i>	MKNF I LLISFYP*
<i>Avena sativa</i>	MKNF I LLISFYP*
<i>Hordeum vulgare</i>	MKNF I LLISFYP*

Abbildung 27: Sequenz des potentiellen Peptids PEP12

a mRNA- und Peptidsequenz und deren Veränderung durch Edierung (Mais).

b „Alignment“ des potentiellen Peptids verschiedener Gräserpezies. Die durch Edierung veränderte Aminosäure wurde eingerahmt.

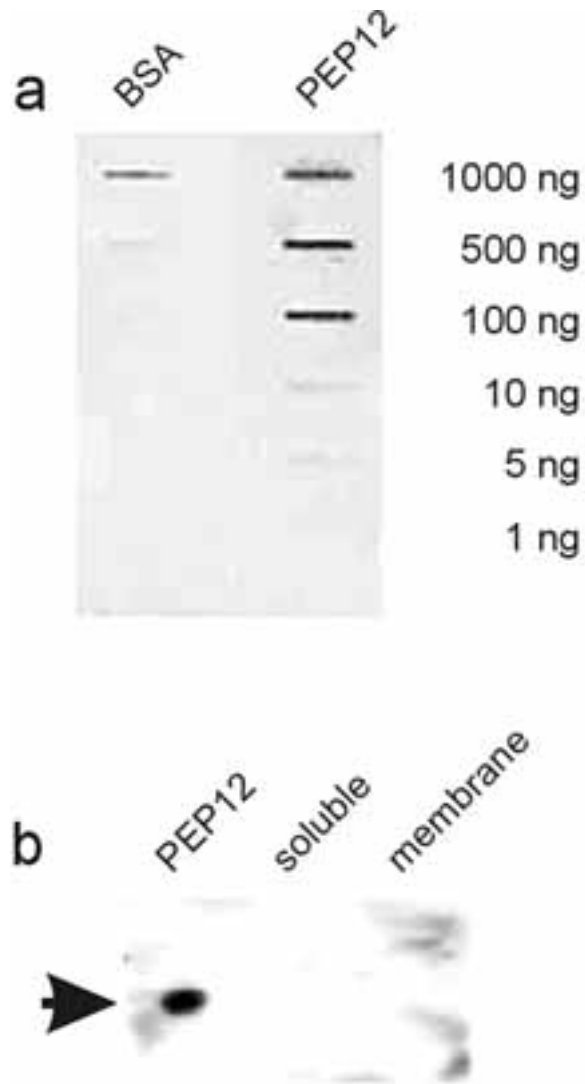


Abbildung 28: Westernanalysen mit dem synthetisierten Peptid PEP12

a „Slot Blot“ mit PEP12 in verschiedenen Verdünnungen (rechts) im Vergleich zu Verdünnungen von BSA (links), an das es zur Überexprimierung gebunden war.

b „Western Blot“ eines Laemmli-Gradientengels (12-22 %), auf dem (von links nach rechts) 5 μ g PEP12 und je 50 μ g lösliche Proteinfraction und Membranfraction von Mais aufgetragen worden waren.

3.3.2 Untersuchungen an Mais-Mutator-Mutanten

Zur Suche von nukleär kodierten Plastidenfaktoren wurden durch das Mutator-Transposon induzierte Maismutanten (z.B. Barkan *et al.* 1986, 1994, Voelker & Barkan 1995, Jenkins *et al.* 1997, Barkan & Goldschmidt-Clermont 2000) hergestellt und unter anderem auf Edierungsausfälle hin untersucht. In einigen Linien war das Fehlen von Edierung der Edierungsstelle des *petB*-Gens beobachtet worden. Das *petB*-Gen kodiert für die Untereinheit Cytochrom *b₆* des Cytochrom *b₆/f*-Komplexes, ist Teil eines polyzistronischen Transkripts und wird durch ein langes Intron unterbrochen, wobei das erste Exon nur 16 Bp (in Mais) lang ist. Schon in ungespleißten *petB/petD*-Transkripten von Mais wurde vollständig edierte mRNA nachgewiesen (Freyer *et al.* 1993). Die Edierungsstelle im *petB*-Gen befindet sich an der Kodonposition 204 und kommt außerdem in einigen weiteren Gräsern, aber auch in Tabak vor, wo festgestellt wurde, daß schon ungespleißte Transkripte ediert vorliegen, und Edierung auch in nichtphotosynthetischem Gewebe erfolgt (Hirose *et al.* 1994). In diesem Fall handelt es sich um eine besonders wichtige Edierungsstelle, weil bei Einbau einer falschen Aminosäure an dieser Stelle die Funktion des Proteins erheblich beeinträchtigt ist. Es handelt sich um ein Leucin, das Teil einer α -Helix ist, die für das Binden einer Hämgruppe verantwortlich zeichnet. Ohne RNA-Edierung wird an dieser Stelle für ein Prolin kodiert, eine Aminosäure, die dafür bekannt ist, α -Helices aufzubrechen (Freyer *et al.* 1993). Die Bedeutung dieses Leucins, das in Mais und Tabak nach Edierung aus dem ursprünglichen Prolinkodon hervorgeht, wurde durch Transformation des Prolinkodons in *Chlamydomonas reinhardtii*, das an dieser Stelle bereits ein Leucin besitzt, getestet (Zito *et al.* 1997): Um sicher zu gehen, daß *Chlamydomonas* nicht in der Lage war, die Stelle zu edieren, wurde in einem zweiten Ansatz ein anderes Prolinkodon (CCT) als das in den Edierern vorkommende (CCA) an Stelle des Leucinkodons (TTA) eingefügt. Es konnte nachgewiesen werden, daß in den Mutanten keine Hämbindung des Cytochrom *b₆/f*-Komplexes erfolgte. Erwartungsgemäß zeigten die Mutanten einen sogenannten *hcf*-Phänotyp (high chlorophyll fluorescent), der ein Fluoreszenzmuster zeigt, das auf einen Ausfall des Cytochrom *b₆/f*-Komplexes rückschließen läßt (wie in Abbildung 31). Typisch ist auch das blasse und schwächliche Erscheinungsbild solcher Mutanten (wie in Abbildung 30).

Im Zuge der vorliegenden Arbeit wurden für ausführlichere Experimente jeweils zehn Samen verschiedener Maismutatormutantenlinien, bei denen bereits Ausfälle in der *petB*-Edierung beobachtet worden waren, gesät. Nach 10 Tagen wurden die Blätter entnommen und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Hieraus wurde RNA isoliert und durch reverse Transkription

in cDNA umgeschrieben (siehe Kapitel 2.7). Ein PCR-Produkt aus dieser cDNA mit den „Primern“ petP1 und petP2 wurde mit dem „Primer“ petBseq (LI-COR) oder mit petPseq (ABI) sequenziert, und die Edierungsrate wurde im Vergleich zur Wildtypedierung, die bei Maisblattmaterial zu 100 % erfolgt, untersucht. Einige der Mutanten waren an dieser Stelle nicht vollständig ediert, d.h. das dort sowohl ein Cytidin als auch ein Thymin gelesen wurden (siehe Abbildung 29). Das korrelierte nicht immer mit dem Befund einer im Vergleich zum Wildtyp sichtbar veränderten Fluoreszenz, weswegen in sämtlichen Mutanten die Fluoreszenz gemessen wurde (siehe Tabelle 9). Oft waren die Mutanten allerdings schon durch ihr blasses Erscheinungsbild und ihren im Vergleich zum Wildtyp kleinen Wuchs zu erkennen (siehe Abbildung 30). Im Extremfall sind solche Mutanten nicht über das Keimlingsstadium hinaus lebensfähig, wenn der Samen aufgebraucht ist und Photosynthese zur Energiegewinnung notwendig wird (Mourad *et al.* 1989).

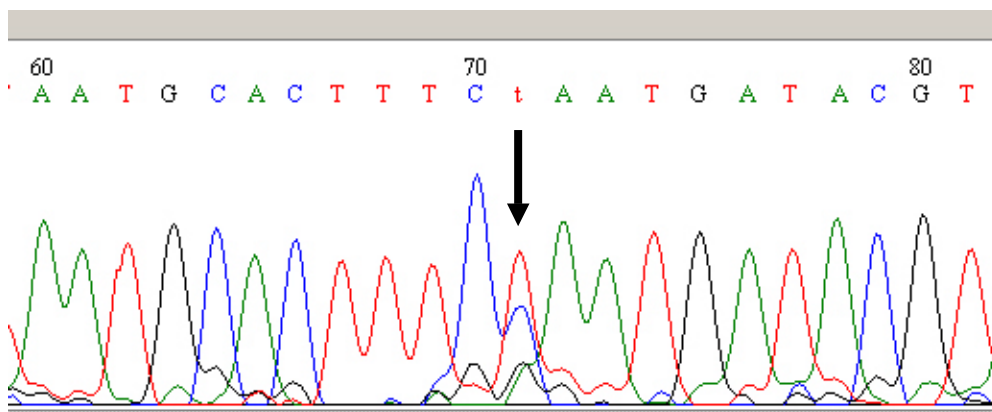


Abbildung 29: Sequenz um die *petB*-Edierungsstelle

In der gezeigten Beispielsequenz (C34-4 (A), siehe Tabelle 10) befindet sich die Edierungsstelle an Position 71 (siehe Pfeil). Das in der Wildtyp-DNA an dieser Stelle vorkommende Cytidin, ist in der cDNA der Mutante noch zu erkennen, wobei hier das Thymin mengenmäßig überwiegt. Bei Wildtyp-cDNA stünde das Thymin allein.

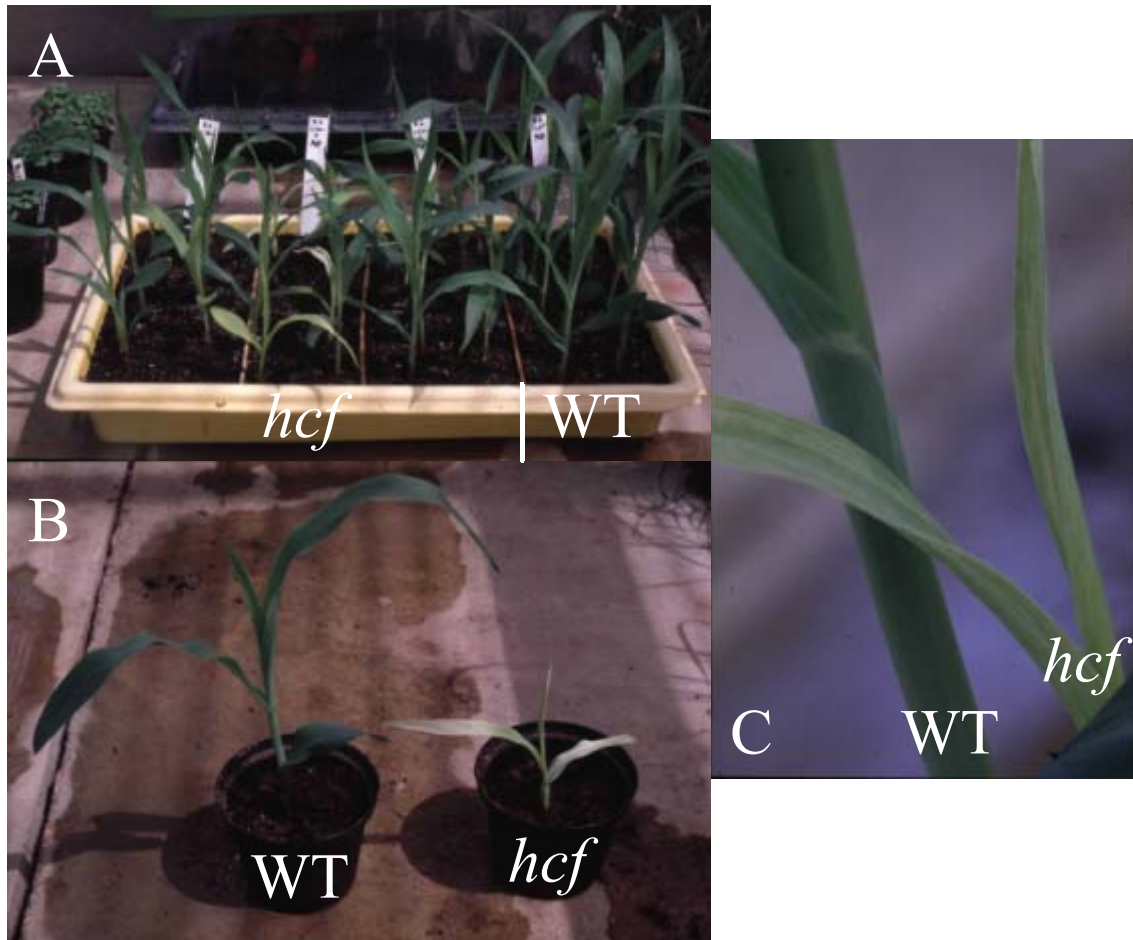


Abbildung 30: Morphologie der Maismutatorvarianten

A: Schale mit vier Maislinien (je 10 Pflanzen): C34-8, C34-4, C34-1 und WT (von links nach rechts), siehe Tabelle 9.

B: direkter Vergleich einer Wildtyppflanze mit einer Mutante mit besonders stark ausgeprägtem *hcf*-Phänotyp.

C: Detailansicht der Pflanzen aus B.

Fluoreszenz entsteht unter anderem, wenn nach Lichteinfall im Zuge der Photosynthese Plastochinon A (Q_A) reduziert wird, wobei die Geschwindigkeit und Stärke der Reduktion davon abhängt, wie lange die Pflanze vorher im Dunkeln gestanden hat. Der typische Kurvenverlauf zeigt einen zunächst mehr oder weniger steilen Anstieg zu einem Maximum, dem ein Abfall bis zu einem konstanten Niveau folgt, wobei dieser Abfall typischerweise zunächst schneller und dann sanfter erfolgt (siehe Abbildung 31, WT-Kurve). Bei längerer Adaptation an Dunkelheit kann es noch zu einem oder mehreren oszillierenden Zwischenpeaks kommen. Der Abfall der Kurve reflektiert die Reoxidation von Q_A , das verstärkt Elektronen abgeben kann, wenn der Elektronentransfer der Photosynthesekette erst einmal in Gang gekommen ist, was sich beim extremen Übergang vom Dunkel ins Licht oszillierend auf ein Gleichgewicht einpendeln muß (Zwischenpeaks). Im Fall der *petB*-

Edierungsmutanten jedoch ist der Elektronentransport unterbrochen, weil intakter Cytochrom- b_6/f -Komplex fehlt. Der einmal erreichte Reduktionstatus bleibt erhalten, so daß nach dem anfänglichen Anstieg ein gerader Kurvenverlauf zu beobachten ist (siehe Abbildung 31, *hcf*-Kurve). Vor dem beschriebenen steilen Fluoreszenzanstieg nach Applikation eines Lichtpulses, wurde eine niedrige Grundfluoreszenz gemessen, die auf angeregte Chlorophyll a Moleküle im Antennenkomplex von Photosystem II zurückzuführen ist. Bei den bereits erblaßten Mutanten scheinen im allgemeinen weniger Photosynthesekomplexe vorhanden zu sein, weswegen sowohl das Maximum der Grundfluoreszenz als auch das Maximum der induzierten Fluoreszenz niedriger als beim Wildtyp ausfallen (vergleiche in Tabelle 9), wo helle Blätter fast immer mit *hcf*-Fluoreszenz korrelieren.

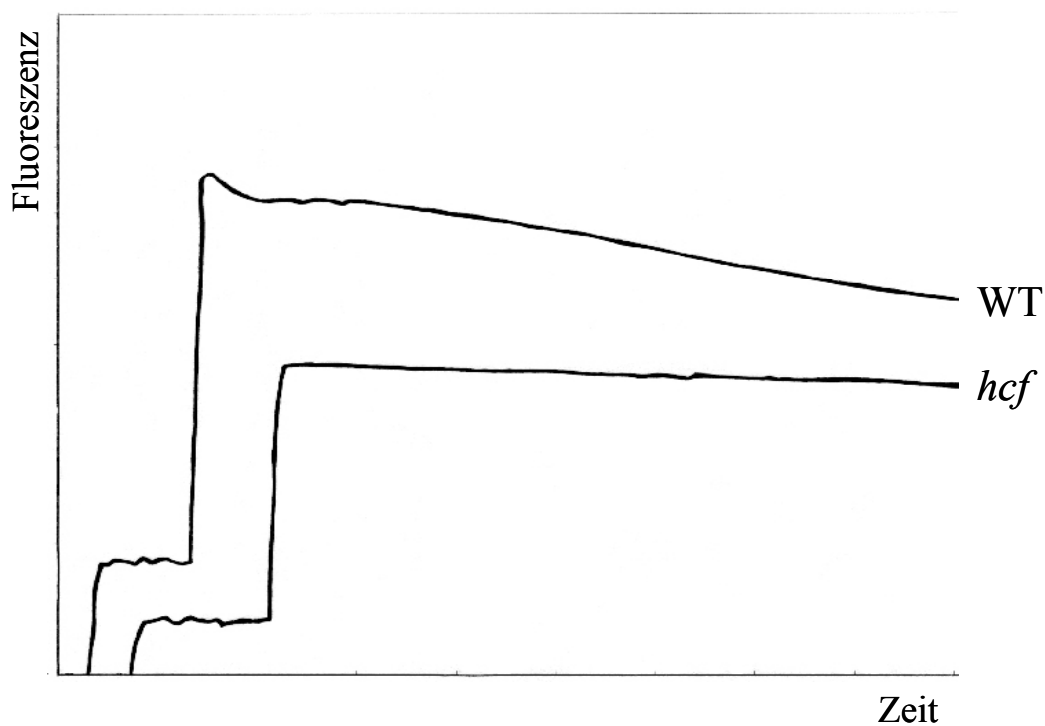


Abbildung 31: Typische Fluoreszenzkurven von Wildtyp- und *hcf*-Pflanzen

hcf – „high chlorophyll fluorescent“, WT – Wildtyp (Erklärung zum Kurvenverlauf siehe Text)

C263-3	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j
Blattfärb.	<i>dunkel</i>	<i>hell</i>	<i>mittel</i>	<i>mittel</i>	<i>mittel</i>	<i>dunkel</i>	<i>mittel</i>	<i>abgest.</i>	<i>dunkel</i>	<i>mittel</i>
Fluoresz.	<i>WT</i>	<i>hcf</i>	<i>WT</i>	<i>WT</i>	<i>WT</i>	<i>WT</i>	<i>WT</i>	-	<i>WT</i>	<i>WT</i>
Edierung	70 %	<i>WT</i>	80 %	<i>WT</i>	<i>WT</i>	90 %	<i>WT</i>	-	<i>WT</i>	<i>WT</i>
C263-1	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j
Blattfärb.	<i>hell</i>	<i>mittel</i>	<i>mittel</i>	<i>dunkel</i>	<i>hell</i>	<i>mittel</i>	<i>hell</i>	<i>abgest.</i>	<i>n. gek.</i>	<i>n. gek.</i>
Fluoresz.	<i>hcf</i>	<i>WT</i>	<i>hcf</i>	<i>WT</i>	<i>hcf</i>	<i>WT</i>	<i>hcf</i>	-	-	-
Edierung	<i>WT</i>	<i>WT</i>	50 %	<i>WT</i>	<i>WT</i>	<i>WT</i>	<i>WT</i>	-	-	-
C40-2	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j
Blattfärb.	<i>mittel</i>	<i>mittel.</i>	<i>abgest.</i>	<i>dunkel</i>	<i>dunkel</i>	<i>dunkel</i>	<i>dunkel</i>	<i>dunkel</i>	<i>mittel</i>	<i>abgest.</i>
Fluoresz.	<i>WT</i>	<i>hcf</i>	-	<i>WT</i>	<i>hcf</i>	<i>ZT</i>	<i>ZT</i>	<i>WT</i>	<i>WT</i>	-
Edierung	<i>WT</i>	90 %	-	<i>WT</i>	<i>WT</i>	<i>WT</i>	<i>WT</i>	<i>WT</i>	<i>WT</i>	-
C260-9	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j
Blattfärb.	<i>dunkel</i>	<i>hell</i>	<i>dunkel</i>	<i>mittel</i>	<i>dunkel</i>	<i>mittel</i>	<i>mittel</i>	<i>mittel</i>	<i>mittel</i>	<i>hell</i>
Fluoresz.	<i>WT</i>	<i>hcf</i>	<i>WT</i>	<i>WT</i>	<i>WT</i>	<i>WT</i>	<i>WT</i>	<i>ZT</i>	<i>WT</i>	<i>hcf</i>
Edierung	<i>WT</i>	90 %	<i>WT</i>	<i>WT</i>	<i>WT</i>	<i>WT</i>	<i>WT</i>	<i>WT</i>	<i>WT</i>	90 %
AB763-3	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j
Blattfärb.	<i>dunkel</i>	<i>mittel</i>	<i>mittel</i>	<i>mittel</i>	<i>mittel</i>	<i>dunkel</i>	<i>dunkel</i>	<i>dunkel</i>	<i>n. gek.</i>	<i>n. gek.</i>
Fluoresz.	<i>WT</i>	<i>hcf</i>	<i>hcf</i>	<i>WT</i>	<i>WT</i>	<i>WT</i>	<i>WT</i>	<i>WT</i>	-	-
Edierung	<i>WT</i>	90 %	<i>WT</i>	<i>WT</i>	<i>WT</i>	<i>WT</i>	<i>WT</i>	<i>WT</i>	-	-
C34-1	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j
Blattfärb.	<i>hell</i>	<i>mittel</i>	<i>mittel</i>	<i>mittel</i>	<i>mittel</i>	<i>mittel</i>	<i>hell</i>	<i>dunkel</i>	<i>mittel</i>	<i>mittel</i>
Fluoresz.	<i>hcf</i>	<i>WT</i>	<i>WT</i>	<i>WT</i>	<i>WT</i>	<i>WT</i>	<i>WT</i>	<i>WT</i>	<i>WT</i>	<i>WT</i>
Edierung	70 %	80 %	60 %	50 %	<i>WT</i>	90 %	80 %	<i>WT</i>	90 %	90 %
C139-9	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j
Blattfärb.	<i>mittel</i>	<i>dunkel</i>	<i>mittel</i>	<i>mittel</i>	<i>mittel</i>	<i>hell</i>	<i>mittel</i>	<i>mittel</i>	<i>abgest.</i>	<i>mittel</i>
Fluoresz.	<i>WT</i>	<i>WT</i>	<i>hcf</i>	<i>WT</i>	<i>WT</i>	<i>WT</i>	<i>WT</i>	<i>WT</i>	-	<i>WT</i>
Edierung	<i>WT</i>	<i>WT</i>	90 %	<i>WT</i>	<i>WT</i>	<i>WT</i>	<i>WT</i>	<i>WT</i>	-	<i>WT</i>
C34-4	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j
Blattfärb.	<i>dunkel</i>	<i>mittel</i>	<i>mittel</i>	<i>mittel</i>	<i>hell</i>	<i>hell</i>	<i>mittel</i>	<i>hell</i>	<i>mittel</i>	<i>mittel</i>
Fluoresz.	<i>WT</i>	<i>WT</i>	<i>WT</i>	<i>WT</i>	<i>hcf</i>	<i>WT</i>	<i>WT</i>	<i>hcf</i>	<i>WT</i>	<i>WT</i>
Edierung	80 %	90 %	90 %	<i>WT</i>	90 %	80 %	90 %	<i>WT</i>	80 %	<i>WT</i>
C34-8	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j
Blattfärb.	<i>mittel</i>	<i>mittel</i>	<i>hell</i>	<i>hell</i>	<i>dunkel</i>	<i>mittel</i>	<i>abgest.</i>	<i>hell</i>	<i>mittel</i>	<i>n. gek.</i>
Fluoresz.	<i>WT</i>	<i>WT</i>	<i>hcf</i>	<i>hcf</i>	<i>WT</i>	<i>WT</i>	-	<i>hcf</i>	<i>WT</i>	-
Edierung	<i>WT</i>	80 %	80 %	80 %	<i>WT</i>	<i>WT</i>	-	80 %	90 %	-

Tabelle 9: Fluoreszenz und Edierung der Maismutatormutanten

Blattfärb.: Blattfärbung, Fluoresz.: Fluoreszenz (Kurvenverlauf), *hcf*: „high chlorophyll fluorescent“-Phänotyp, WT: Wildtyp-Phänotyp bzw. –Edierung, ZT: Zwischentyp, n. gek.: nicht gekeimt, abgest.: Pflanze vor Blattprobenentnahme abgestorben. a-j bezeichnen 10 Individuen der jeweiligen Mutantenlinie, deren Name in der ersten Zeile steht.

In einer Northernanalyse mit einer *petB*-spezifischen Sonde (PCR-Produkt aus Mais-cDNA mit den „Primern“ petP1 und T7petB) sollte bei einer ausgewählten *hcf*-Pflanze, C34-1-d (siehe Tabelle 9), überprüft werden, ob die Transkription des Operons in den Mutanten ein verändertes Muster aufweist (siehe Abbildung 32). Die erwarteten Fragmentgrößen wurden in dieser Mutante genau wie im Wildtyp (Barkan *et al.* 1994) beobachtet. Die untersuchte Mutante zeigte nur noch 50 % der normalen Edierungsrate. Weder die Transkriptionsrate noch der Spleißprozeß scheinen beeinträchtigt.

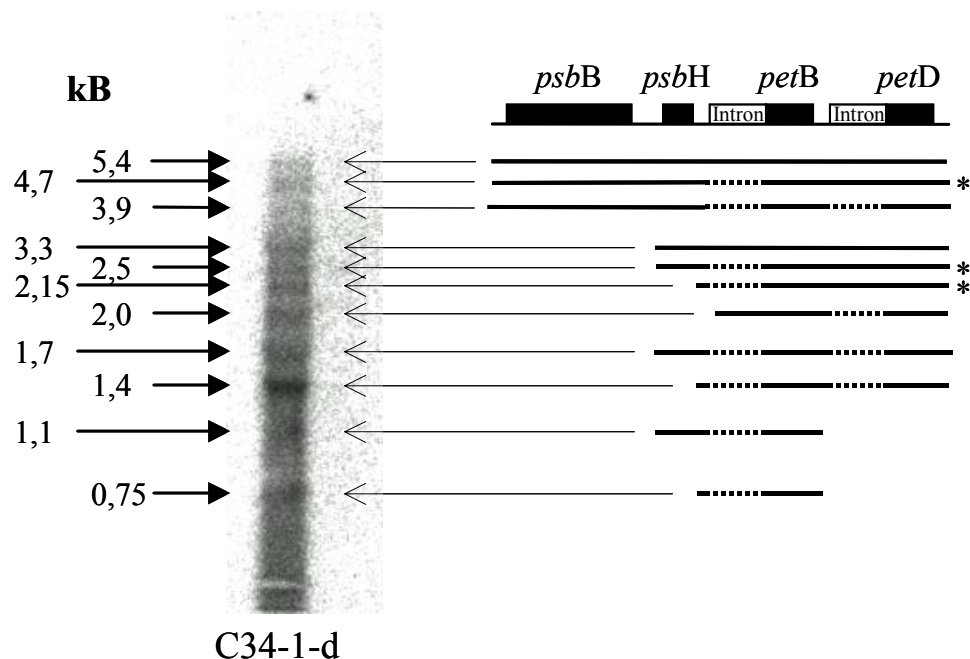


Abbildung 32: *petB*-Northernanalyse

„Northern Blot“ mit 10 µg RNA der Mutante C34-1-d. Rechts sind sämtliche Wildtyptranskriptlängen (nach Barkan *et al.* 1994) des *petB*-haltigen Operons, die mit *petB*-spezifischer Sonde zu erwarten sind, erläutert, wobei den mit einem * versehenen Transkriptlängen alternativ das *petD*-Intron fehlen kann. Links sind die Transkriptlängen in kB angegeben.

Später wurden noch einmal je 10 Samen der Linien C34-1 und C34-4 ausgesät und untersucht (siehe Tabelle 10), wobei eine C34-4 Pflanze (A) die niedrigste Edierungsrate (20 %, siehe Abbildung 29) aufwies und in weitere Untersuchungen einbezogen wurde. Eine weitere Aussaat von je 30 Samen, ergab keine Pflanzen mit beeinträchtigter Edierung.

Bezeichnung der Pflanze	Phänotyp	Edierungsrate (%)
C34-1 (A)	<i>hcf</i>	80
C34-1 (B)	WT	90
C34-1 (C)	WT	90
C34-1 (D)	WT	100
C34-1 (E)	WT	100
C34-1 (F)	<i>hcf</i>	90
C34-1 (G)	<i>hcf</i>	80
C34-1 (H)	<i>hcf</i>	50
C34-1 (I)	WT	100
C34-1 (J)	<i>hcf</i>	80
C34-4 (A)	<i>hcf</i>	20
C34-4 (B)	WT	90
C34-4 (C)	WT	90
C34-4 (D)	<i>hcf</i>	60
C34-4 (E)	WT	100
C34-4 (F)	<i>hcf</i>	50
C34-4 (G)	WT	100
C34-4 (H)	<i>hcf</i>	90
C34-4 (I)	<i>hcf</i>	70
C34-4 (J)	WT	80

Tabelle 10: Edierung bei den Mutanten der zweiten Aussaat

hcf – „high chlorophyll fluorescent“-Phänotyp, WT - Wildtyp-Phänotyp

So sollte bei der Pflanze C34-4 (A) herausgefunden werden, ob bei dieser Mutante noch andere Edierungsstellen beeinträchtigt sind. Die meisten Edierungsstellen, die getestet wurden, zeigten sehr hohe Edierungsraten (80-100 %, siehe Tabelle 11). Einzig die im *rpl2*-Gen scheint beeinträchtigt, wo nur zu etwa 50 % ediert wurde (siehe Abbildung 33).

Edierungsstelle (Gen)	verwendete „Primer“	Edierungsrate (%)
matK	K6/K7	80
ndhB -II	nb11/nb-P12	100
ndhB -III	nb11/nb-P12	100
ndhB -IV	nb11/nb-P12	100
ndhB -V	nb11/nb-P12	100
ndhG-„Leader“	RMndhI/RMndhG, ng2	90
rpl2	rpl2rev /rpl23-S	50
ycf3	ycf3-P14 /ycf3-P9	80

Tabelle 11: Untersuchte Edierungsstellen der Mutante C34-4 (A)

In der mittleren Spalte befinden sich die „Primer“, die eingesetzt wurden, um die entsprechenden Edierungsstellen durch PCR von cDNA auf Edierung zu überprüfen. Die „Primer“, die außerdem in die Sequenzierung eingesetzt wurden, sind fett markiert.

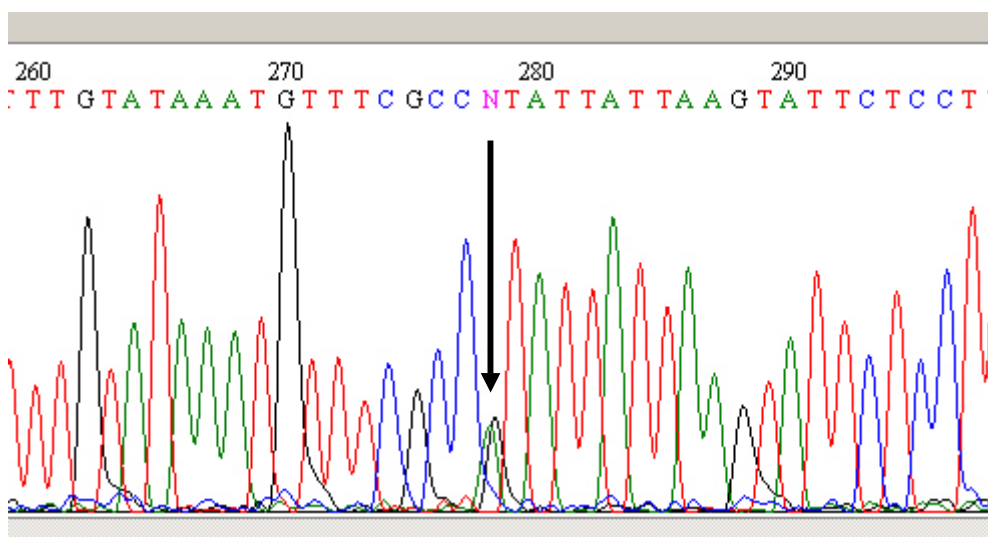


Abbildung 33: Sequenz um die *rpl2*-Edierungsstelle

In der gezeigten cDNA-Sequenz von C24-4 (A) befindet sich die *rpl2*-Edierungsstelle an Position 278 (siehe Pfeil). Die Sequenzierung erfolgte gegen die Leserichtung des Gens. Man sieht also die komplementären Basen A(denosin) statt Thymidin und G(uanosin) statt Cytidin, die in ungefähr gleicher Stärke an dieser Position vertreten sind.

4 Diskussion

4.1 Diskussion zu *ycf1*

4.1.1 *ycf1* – Stand der Forschung

In diesem Kapitel soll zunächst zusammengefaßt werden, was über *ycf1* bisher bekannt ist: *ycf1* enthält keine Introns und wurde bisher nicht bei monokotylen Pflanzen gefunden. Es hat Homologe in *Nicotiana tabacum* (ORF1901, Shinozaki *et al.* 1986), *Marchantia polymorpha* (ORF1068, Ohyama *et al.* 1986), *Epifagus virginiana* (ORF1738, Wolfe *et al.* 1992), *Oenothera berteriana* (ORF1005, Nimzyk *et al.* 1993), *Pinus thunbergii* (ORF1756, Tsudzuki *et al.* 1994), *Arabidopsis thaliana* (ORF1768, Sato *et al.* 1999), *Lotus japonicus* (ORF1794, Kato *et al.* 2000) *Oenothera elata* Plastom I (ORF2464, Hupfer *et al.* 2000), *Spinacia oleracea* (ORF1833, Schmitz-Linneweber *et al.* 2001-a), *Atropa belladonna* (ORF1880, Schmitz-Linneweber *et al.* 2002) und schwächere Homologien in einigen Grünalgen, wie z.B. *Chlorella vulgaris* (ORF1720, Wakasugi *et al.* 1997).

Bemerkenswert dabei ist das Vorkommen von *ycf1* in *Epifagus virginiana*, da dieser Wurzelparasit keinerlei Gene für den Photosyntheseapparat besitzt (Wolfe *et al.* 1992). Es erscheint also unwahrscheinlich, daß das Genprodukt von *ycf1* in die Photosynthese involviert ist.

Die Tatsache, daß *ycf1* in Landpflanzen stark konserviert ist und sonst (in schwächerer Homologie) nur in Grünalgen gefunden wurde, wurde darauf zurückgeführt, daß Grünalgen näher mit den Landpflanzen verwandt sind als Braun- und Rotalgen (Wakasugi *et al.* 1997).

Auch in anderen Fällen wurden zur *ycf1*-Sequenz homologe Regionen gefunden. Im Tomatenkerngenom wurde ein 70 Bp langes Stück gefunden, das um 86 % zu *ycf1* in Tabak homolog ist (Blanchard & Schmidt 1995). Es ist anzunehmen, daß von einem hochkonservierten Gen bei den Pflanzen, bei denen es nicht im Plastom gefunden wird, eine Kernkopie vorhanden ist. Da es sich aber um ein Stück von nur 1,4 % der Gesamtlänge von ca. 5.000 Bp handelt, scheint die Homologie nicht beweiskräftig zu sein. Bei der Recherche mit BLAST finden sich ebenfalls kürzere *ycf1*-Stücke (5'-Bereich des Gens) auf mehreren Kernchromosomen von Reis.

In *Chlamydomonas reinhardtii* wurde ebenfalls ein Homolog zu *ycf1* beschrieben (ORF1995, Boudreau *et al.* 1997), welches von ähnlicher Größe ist wie die oben genannten Beispiele. Da hier nach Transformation eines mutierten ORF1995 die Transformanden heteroplastomisch blieben, d.h. sich ein Gleichgewicht zwischen Mutanten- und Wildtypallel einstellte (siehe Kapitel 2.6.2.3), wurde davon ausgegangen, daß das Genprodukt von ORF1995 für das

Überleben der Zelle essentiell ist. Nach Sequenzanalyse konnten keine Introns gefunden werden. In der Strukturvorhersage wurde N-terminal ein hydrophober Bereich mit fünf Transmembranhelices festgelegt. Der Rest des ORF1995-Genprodukts soll hydrophil und stark geladen sein (vergleiche mit Abbildung 34). In einem „Northern Blot“ konnte ein 7,4 kB langes Transkript mit ORF1995-spezifischen Sonden identifiziert werden, wonach also das gesamte offene Leseraster transkribiert wird. Allerdings sprechen eher strukturelle als sequenzielle Übereinstimmungen für Gemeinsamkeiten zwischen ORF1995 und *ycf1*. So beträgt die Sequenzhomologie zu Tabak z.B. nur 20 %. Signifikante Homologie konnte nur zu offenen Leserastern von *Chlamydomonas eugametos*, *Nephroselmis olivacea* und *Chlorella vulgaris* gefunden werden. Eine Homologie von immerhin 24,7 % gibt es zwischen dem ORF1995-Homolog von *Chlorella* und dem *ycf1*-Homolog von *Marchantia polymorpha*, weswegen die Autoren hier eine Art evolutionäre Zwischenstufe zwischen ORF1995 und *ycf1* postulieren. Allgemein fällt auf, daß die Nukleotidsequenz von *ycf1* in verschiedenen Spezies recht variabel ausfällt. Vergleicht man jedoch die Hydropathieplots der homologen Genprodukte, ist die Verwandtschaft unverkennbar: Man findet immer einen hydrophoben Bereich am Anfang des Gens, während der Rest des Gens nur ein paar wenige Extrembereiche aufweist, die durch längere Bereiche moderater Hydrophilie unterbrochen werden (siehe Abbildung 34).

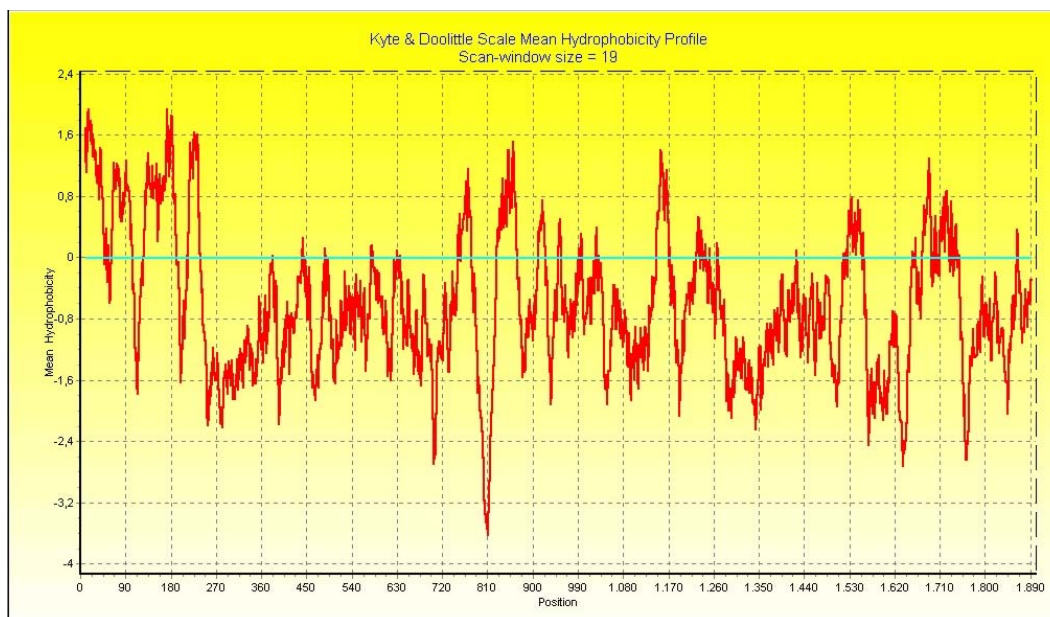


Abbildung 34: Hydropathieprofil von *ycf1* aus Tabak

(nach Kyte & Doolittle 1982)

Typisch ist der hydrophobe Bereich zu Beginn des Gens, während der Rest weitestgehend hydrophil ist.

Bisher konnte zwar Transkription von *ycf1* nachgewiesen werden (Hajdukiewicz *et al.* 1997, Abbildung 2 in Kapitel 3.1.1), aber noch kein funktionelles Genprodukt. Da es sich aber um ein stark konserviertes Leseraster handelt, ist wahrscheinlich, daß es auch zu funktionellen Polypeptiden translatiert wird (Gruissem 1989). Der Transkriptionsstart befindet sich noch im „Inverted Repeats“-Bereich (IR_A), so daß es immer ein kurzes ORF gleicher Sequenz im anderen IR gibt, während der Großteil des restlichen Gens in der kleinen Einzelkopie-Region (SSC) zu finden ist. Abgelesen wird am inneren Strang, also im Uhrzeigersinn (siehe Abbildung 1). Hajdukiewicz *et al.* haben 1997 mit Tabakmutanten, die ein deletiertes *rpoB*-Gen enthalten (später von DeSantis-Maciossek *et al.* 1999 mit *rpoA*, B und C1 ausführlicher untersucht), die Transkription einer Reihe von Genen überprüft, nachdem Allison *et al.* 1996 Transkriptionsaktivität in diesen Mutanten nachweisen konnten. Sie unterteilten die Gene in drei Gruppen: Klasse I enthält Gene, die nur von der plastidenkodierte RNA-Polymerase (PEP) transkribiert werden, für die die Mutanten also keine Transkription zeigten, Klasse II enthält Gene, die sowohl von der kernkodierte (NEP) als auch von der plastomkodierte RNA-Polymerase (PEP) abgelesen werden, und Klasse III enthält Gene, die nur von der kernkodierte RNA-Polymerase (NEP) transkribiert werden (siehe auch Kapitel 1.4.3). In diesem Test wurde *ycf1* der Klasse II zugeordnet. Allerdings konnte für *ycf1* nur ein NEP-Promotor vom Typ Ib mit GAA-Box und YRT-Box in typischem Abstand identifiziert werden (Weihe & Börner 1999, siehe Abbildung 35).

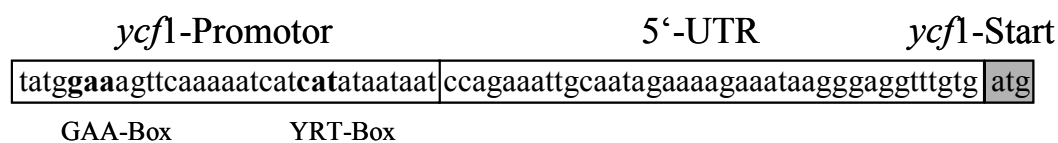


Abbildung 35: Sequenz des *ycf1*-Promotors

Gezeigt ist die *ycf1*-Promotorsequenz von Tabak. Die für einen NEP-Promotor vom Typ Ib typischen Boxen sind fett markiert (nach Weihe & Börner 1999). Der Start des *ycf1*-Gens wurde grau unterlegt.

Außerdem wurde im *ycf1*-Gen ein Replikationsstart (*ori*) entdeckt (Lu *et al.* 1996, Kunni-malaiyaan *et al.* 1997). Er befindet sich am Anfang des Gens. Da sich in diesem Bereich nach Redigieren der Tabaksequenz die Positionen besonders stark verschoben haben, konnte erst nach Veröffentlichung der Sequenz eindeutig zugeordnet werden, an welcher Stelle er

tatsächlich liegt, und ob er für die „knock-out“-Mutanten von Bedeutung ist (Kunnimalaiyaan & Nielsen 1997). Es stellte sich heraus, daß das Deletionskonstrukt (siehe Abbildung 3) tatsächlich ein Stück des Replikationsstarts beinhaltet, so daß nur im Fall der Insertionsmutante weiterhin von einem *ycf1*-„knock-out“ ausgegangen werden kann, wogegen die Deletionsmutante gleichfalls einen *oriB*-„knock-out“ darstellt (Details Abbildung 36). Vor kurzem konnte allerdings gezeigt werden, daß auf eine Kopie von *oriB* und auf *oriA* komplett verzichtet werden kann: in verschiedenen Ansätzen wurden *oriA* und *oriB* durch Plastidentransformation deletiert, wobei lediglich der Ansatz, in dem gleichzeitig *ycf1* deletiert wurde, keine homoplastomischen Linien hervorbrachte (Mühlbauer *et al.* 2002). Im Falle des *oriB*-„knock-outs“ wurden dabei zwei unterschiedliche Konstrukte für die beiden IRs gleichzeitig transformiert, wobei zunächst die Mehrheit der Transformanden (22 von 35) beide Konstrukte in ihrem Plastom integriert zeigten, d.h. beide IRs transformiert waren. Doch schon nach wenigen Regenerationsrunden konnte auch bei diesen nur noch eine der beiden Versionen nachgewiesen werden. Offenbar gibt es einen Selektionsdruck, der eine *oriB*-Kopie erhalten will.

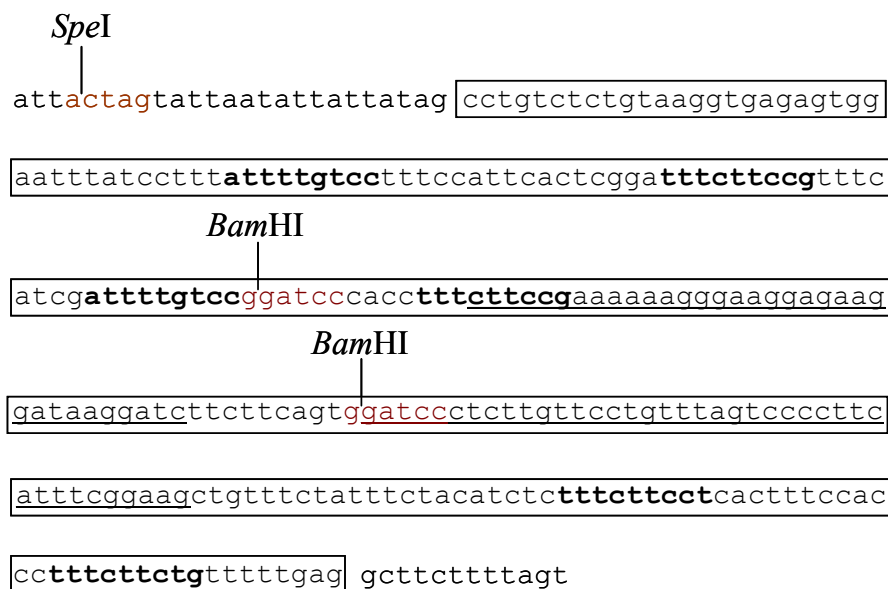


Abbildung 36: Sequenz der *oriB*-Region von Tabak

Die *oriB*-Sequenz (nach Kunnimalaiyaan & Nielsen 1997) wurde eingerahmt. „Repeats“ wurden fett markiert, die Regionen, die eine Stammschleifenstruktur ausbilden, unterstrichen. Die Restriktionsschnittstellen, die für die Konstruktion der „knock-out“-Vektoren verwendet wurden (siehe Abbildung 3), sind rot und namentlich gekennzeichnet; so befindet sich die für die Deletionsmutation verwendete *Bam*HI-Schnittstelle innerhalb des *ori*, während sich die für die Insertionsmutation verwendete *Spe*I-Schnittstelle außerhalb befindet.

4.1.2 Ycf1 - ein plastidärer Replikationsfaktor?

Daß in den oben beschriebenen *ori*-„knock-out“-Experimenten (Mühlbauer *et al.* 2002) lediglich der *oriB*-„knock-out“ im IR_A keine homoplastomischen Linien hervorbrachte, zeigt zum einen, daß beide in Kapitel 3.1.2 beschriebenen Konstrukte als *ycf1*-„knock-outs“ (Abbildung 3) funktionieren, zum anderen, daß ORF350, welches im IR_B liegt und dem 5'-Bereich des *ycf1*-Gens entspricht (bis auf 52 Bp im SSC-Bereich), da es mitsamt seinem *oriB* in getrennten Transformanden homoplastomisch deletiert vorlag, kein essentielles Gen ist. In der Northernanalyse mit einer ebenfalls zu ORF350 komplementären *ycf1*-Sonde (siehe Abbildung 2) konnte kein Transkript von für ORF350 zu erwartender Größe (1.053 Bp) nachgewiesen werden. Somit scheint es sich um kein funktionelles Gen zu handeln, sondern um eine zufällige durch die IR-Grenzen bestimmte funktionslose Kopie des 5'-Bereichs von *ycf1*. Außerdem befindet sich der 5'-Bereich von *ycf1* keineswegs in allen Arten in der „Inverted Repeat“-Region, wobei dann auch ein ORF350-Homolog fehlt. Möglicherweise liegt diese Dopplung des Genstücks nur in Arten vor, in denen sich dort der Replikationsstart befindet, der so wichtig für die Plastide ist, daß eine Sicherung durch eine zweite Kopie sinnvoll erscheint. Abgesehen davon legen vor allem die in der PFGE gefundenen Anomalien der Plastidlängen in den *ycf1*-„knock-out“-Mutanten (siehe Abbildung 10) eine bei der Replikation zu suchende Funktion von *ycf1* nahe, da das Vorhandensein längerer Chromosomen auf Fehlern in der Replikation beruhen könnte. Allerdings wäre nicht einsichtig, warum im heteroplastomischen Zustand keine Kompensierung durch von den anderen Genomen exprimiertes Ycf1-Protein erfolgen sollte; es sei denn, das im RFLP beobachtete Verhältnis zwischen Wildtyp- und Mutantengenom reflektiert das Verhältnis unterschiedlicher Plastidentypen. So ist denkbar, daß es in den Mutanten Wildtypplastiden mit normaler Replikation neben Mutantenplastiden mit gestörter Replikation geben könnte. Morphologisch könnte es sich um die im Elektronenmikroskop beobachteten kleinen Chloroplasten (siehe Abbildung 5) handeln, die nur an den Blatträndern gehäuft beobachtet, in weiter nach innen liegenden Blattbereichen seltener wurden, und die neben gesund aussehenden Wildtypchloroplasten zu finden waren. Die Tatsache, daß auch innerhalb einer Zelle Wildtypchloroplasten und Mutantenchloroplasten beobachtet wurden, untermauert diese Hypothese.

Dabei ist auch zu beachten, daß die Plastidenreplikation von Samenpflanzen unabhängig vom Zellzyklus ist. Um daher die Replikation einzelner Plastiden zu synchronisieren, kann eine Zellkultursuspension in der stationären Phase zur Replikation angeregt werden, indem man sie in frisches Medium gibt (Takeda *et al.* 1992). Höchste Replikationsaktivität findet man in

jungen, sich entwickelnden Plastiden, in unreifen Blattzellen besonders junger Blätter oder in sich erweiternden Blattregionen (Hedrick *et al.* 1993, Sato 2001), wo auch in der Northernanalyse die höchste Transkriptionsrate (Blattprimordien, siehe Abbildung 2) und in der Westernanalyse am ehesten das Ycf1-Protein nachgewiesen werden konnte (siehe Kapitel 3.1.5). Da es sich bei der Plastidenreplikation durchaus um eine essentielle Eigenschaft handelt, könnte eine noch eindeutig zu beweisende Rolle von *ycf1* hierbei die Ergebnisse der „knock-out“-Experimente erklären.

Andererseits könnte die erhöhte *ycf1*-Expression bei bestimmten Temperaturschwankungen (siehe Abbildung 14) auf einen Transkriptionsfaktor deuten, der für einen kurzen Zeitausschnitt für das Anschalten bestimmter Reparaturgene verantwortlich zeichnet.

4.1.3 Zum Einsatz des blaulichtinduzierten *psbD*-Promotor

Dem *psbD-psbC*-Operon sind mehrere Promotoren vorangestellt (Sexton *et al.* 1990). Bei dem für die beschriebenen Experimente verwendeten Promotor (Abbildung 37) handelt es sich um einen blaulichtinduzierten PEP-Promotor, der sich bei Tabak zwischen den Positionen 33.485 und 33.565 des Plastidenchromosoms befindet. Erstmals 1988 wurde beschrieben, daß vom *psbD-psbC*-Operon in Gerste bei Etioplasten andere Transkripte akkumulierten als in Chloroplasten (Gamble *et al.* 1988). Ein Jahr später wurde entdeckt, daß das *psbD-psbC*-Operon in Tabak von mehr als einem Promotor ausgehend abgelesen wird (Yao *et al.* 1989): Es wurden fünf Transkriptionsstarts gefunden. Schließlich zeigte sich, daß der lichtinduzierte Promotor durch blaues und UV/A-Licht induzierbar ist (Gamble & Mullet 1989). Es wird angenommen, daß damit die D2-Synthese (Genprodukt von *psbD*) nach Schäden durch UV-Licht aufrecht erhalten werden soll (Christopher *et al.* 1999). Nach „transcript mapping“- und „capping“-Experimenten bei Gerste wurden vier Transkriptionsstarts gefunden, denen auch eine -35/-10 Promotorkonsensussequenz zugeordnet werden konnten (Sexton *et al.* 1990). Davon wurde einer ausschließlich bei Pflanzen gefunden, die im Licht gewachsen waren. Dieser Promotor liegt hochkonserviert in verschiedenen Monokotyledonen- und Dikotyledonenarten vor und kommt sogar in Cyanobakterien vor (Christopher *et al.* 1992).

In Experimenten mit dem an das Markergen *uidA* fusionierten *psbD*-Promotor zeigten nur im Hellen gewachsene Transformanten ein *uidA*-Transkript, während ans Dunkle adaptierte Pflanzen kein Signal erbrachten (Allison & Maliga 1995). In Deletionsversuchen dieses

Konstruktes wurde weiter getestet, welche Regionen des Promotors für die Transkription wichtig sind: Schon die Deletion der PGT-Box (siehe Abbildung 37) verringert die Transkriptionsrate erheblich, während die AAG-Box für die Lichtinduzierbarkeit und die Aufrechterhaltung eines zirkadianen Rhythmus (Thum *et al.* 2001) verantwortlich zeichnet. In „gel mobility-shift assays“ konnte eine Bindung der „repeats“ mit Protein in Chloroplastentranskriptionsextrakten nachgewiesen werden. Ähnliches wurde mit dem Gerstenpromotor in einem cyanobakteriellen Expressionssystem mit *lacZ* als Reportergen gefunden (Christopher *et al.* 1999). Dabei wurde festgestellt, daß die PGT-Box eine Art Negativregulator darstellt, der durch Bindung eines Repressors die Transkription verhindert, wobei dies mit zunehmender Blattentwicklung abnimmt, d.h. der Promotor ist in jungem Gewebe inaktiv. Durch Transformation des Gerste-*psbD*-Promotors mit *uidA* in Tabak, wo er einwandfrei funktionierte, konnte zusätzlich die -10 Box des „Core“-Promotors als wichtig identifiziert werden, wogegen die Deletion der -35 Box keinerlei Effekt hatte (Thum *et al.* 2001). Damit wurde die vorher durchgeführte detaillierte *in vitro*-Charakterisierung des Gerstenpromotors bestätigt (Kim *et al.* 1999).

```

tcttgaactcaccgaatattcctat
          PGT-Box
  tttccattataccaaccaaatccattcgaaaggttagaaatc

          AAG-Box
  aacaaaagaaaaagtaagtggacctgacctta
          A1  A2  B1  B2

          „Core“-Promotor
  ttgaatcatgactatatccgctattctgatatta
  -35                    -10
          5'-UTR
  aaattcgatagagatgaaattggagcagttgatttttttttaatttcatt

  tttttgtttggattccacaagaatttgtctctagaaga

```

Abbildung 37: Sequenz des verwendeten *psbD*-Promotors

Gezeigt ist die amplifizierte Sequenz, die anstelle des *ycf1*-Promotors eingefügt wurde (siehe Kapitel 3.1.3). Die „Primer“-Bereiche, die nach Restriktion noch vorhanden waren, sind fett gedruckt. Die aktiven Promotorbereiche wurde eingerahmt (nach Thum *et al.* 2001), wobei die -35/-10 Promotorkonsensussequenzen dunkelrot gefärbt wurden. Die „Repeats“ der AAG-Box wurden unterstrichen und bezeichnet (A1/2 und B1/2).

Kürzlich wurde in *Arabidopsis* ein σ -Faktor, Sig5, für die Lichtabhängigkeit des *psbD*-Promotors verantwortlich gemacht (Tsunoyama *et al.* 2002). Bei der Arbeit mit *Arabidopsis*-Mutanten wurde der Repressor identifiziert (Christopher & Hoffer 1998) und entdeckt, daß im Wildtyp bei jungen Keimlingen zwar ein Transkript zu finden war, aber um einiges schwächer ausgeprägt als bei älteren Keimlingen, wo diesbezüglich ein analoger Unterschied zwischen Kotyledonen und älteren Blättern gefunden wurde. Im Gegensatz dazu scheint *ycf1* vor allem in jungem Gewebe benötigt zu werden, was in den Promotoraustauschmutanten am Anfang zu dem Wildtyp vergleichbaren Transkriptionsraten führen könnte. Erst im Laufe der Entwicklung sollte dann allmählich eine Überexpression stattfinden. So stammt das starke Ycf1-Fragment in der Westernanalyse mit einer Promotoraustauschmutante aus Blattmaterial einer sechs Wochen alten Pflanze (siehe Abbildung 13-B, PD), wohingegen in Keimlingen keine Expression nachgewiesen werden konnte.

4.2 Diskussion zu *ycf14*

4.2.1 MatK - ein plastidärer Spleißfaktor?

Wie schon in Kapitel 1.4.4 kurz angedeutet, wird angenommen, daß es sich bei dem Genprodukt des *ycf14*-Gens – MatK (Expression nachgewiesen von du Jardin *et al.* 1994) – um einen plastidären Spleißfaktor handeln könnte (Vogel *et al.* 1997). Erster Hinweis war zunächst die Homologie zur Domäne X einer Gruppe von Intronmaturasen. Üblicherweise befinden sich diese innerhalb des Introns, für dessen Spleißen sie auch verantwortlich sind; genauer gesagt bei einer Gruppe II Intron in dessen Domäne IV, einer Substruktur, der beim Spleißen keine führende Rolle zukommt (Mohr *et al.* 1993). Im Fall von *ycf14* wäre das das Intron des *trnK*-Gens für die tRNA^{Lys}UUU. Daß *ycf14* allerdings auch in *Epifagus virginiana* vorkommt, wo es kein *trnK*-Gen und damit auch nicht dessen Intron gibt, deutet an, daß MatK entweder eine andere Funktion inne hat oder auch für das Spleißen anderer Introns mitverantwortlich ist (Ems *et al.* 1995). Ein möglicher Hinweis darauf ist die Beobachtung, daß in der Ribosomen-defizienten Gerstenmutante *albostrians*, in der keine *ycf14*-Translation erfolgt (von Vogel *et al.* 1999 in einem „Western Blot“ bestätigt), das Spleißen aller Gruppe IIA Introns (*atpF*, *rpl2*, *rps12 cis*, *trnA/I/K*) inhibiert ist. Dies wird als Hinweis darauf gewertet, daß es nur einen plastidenkodierten plastidären Spleißfaktor zu geben scheint. Ebenso ist das Spleißen einiger Gruppe IIB Introns (*ndhA*, *rps12 trans*, *trnG*) etwas reduziert (Hess *et al.* 1994-a, Hübschmann *et al.* 1996, Vogel *et al.* 1997 und 1999), was ein unspezifischer Neben-

effekt sein könnte. Auffällig ist zudem, daß es nur in Arten, die kein *ycf14*-Gen besitzen, keine Gruppe IIA Introns gibt (Diatomeen, Rotalgen, Glaucocystophyten und Cyanobakterien, Thompson *et al.* 1995, Kowallik *et al.* 1995, Reith & Munholland 1995, Stirewalt *et al.* 1995, Kaneko *et al.* 1996). Außerdem wurde für MatK *in vitro* RNA-Bindeaktivität nachgewiesen (Liere & Link 1995). Ein in den Chloroplasten von *Chlamydomonas* eingeführtes Tabakplastidenintron der Gruppe IIA (*atpF*) konnte nicht gespleißt werden; wahrscheinlich, weil ihm der plastideneigene Spleißfaktor MatK fehlte (Deshpande *et al.* 1995) - das inzwischen komplett sequenzierte Plastom von *Chlamydomonas reinhardtii* enthält kein *ycf14*-Gen (Simpson & Stern 2002).

Interessant im Hinblick auf die Evolution von Intronmaturasen ist, daß die bekannten funktionellen Maturasen noch andere Elemente enthalten, die auf eine Verwandtschaft mit Retroelementen vom Typ „non-LTR (long terminal repeats)“ hinweisen. Auch im Fall von *ycf14* gibt es neben der Domäne X noch einen Bereich schwächerer Homologie mit den Sequenzblocks V, VI und VII der reversen Transkriptase von Retroviren wie z.B. HIV (Mohr *et al.* 1993). In Hefe wurde durch Mutagenese verschiedener Bereiche des *COXI*-Introns gezeigt, daß die Domäne X allein für das Spleißen des Introns genügte (Moran *et al.* 1994). Mitochondriale Intronmaturasen weisen zudem Homologien zur viralen Protease, den Sequenzblocks I-IV der reversen Transkriptase und in einigen Fällen auch einer Zinkfingerdomäne der Integrase von Retroviren auf (Mohr *et al.* 1993). Dies erklärt, warum die Verteilung von Intronmaturasen auf eine frühere Mobilität hinweist. In dem Bakterium *Lactococcus lactis* konnte gezeigt werden, wie ein Gruppe II-Intron mit Hilfe eines eigenen Genprodukts, das neben Maturaseaktivität noch reverse Transkriptase- und Endonukleaseaktivität besitzt, in eine neue Genomposition integriert wurde; dieser Prozeß wird „retrohoming“ genannt (Curcio & Belfort 1996, Cousineau *et al.* 2000).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnten zeigen, daß *ycf14* nicht bzw. nicht ausschließlich für das Spleißen des *trnK*-Introns verantwortlich ist, denn in diesem Fall hätten die Transformanten mit dem intronlosen *trnK*-Gen keinen Selektionsnachteil im Vergleich zum Wildtyp zeigen dürfen. Der Zusammenhang zwischen MatK und Spleißen muß jedoch noch bewiesen werden. Daß das Genprodukt von *ycf14* eine wichtige Funktion inne hat, deutete aber schon eine Edierungsstelle in Mais und Gerste in einem hochkonservierten Kodon (Position 426) an (Vogel *et al.* 1997). Kommt eine Edierungsstelle in mehr als einer Spezies vor und stellt damit eine konservierte Position wieder her, kann man davon ausgehen, daß es sich um eine wichtige Aminosäure im späteren Translationsprodukt handelt (Maier *et al.*

1996). Die Tatsache, daß im Falle der *ycf14*-„knock-out“-Mutanten keine homoplastomischen Linien gewonnen werden konnten, unterstützt diese Annahme.

Tabakpflanzen können im Gegensatz zu manch anderer Spezies (Raps – Zubko & Day 1998 und 2002, Gerste – z.B. Hess 1994-b, Mais – z.B. Walbot & Coe 1979, Silhavy & Maliga 1998) nicht ohne plastidäre Translation überleben (Zubko & Day 1998 und 2002). Geht man also davon aus, daß *ycf14* auch für das Spleißen einiger Gene für ribosomale Untereinheiten und tRNAs verantwortlich ist, sind keine homoplastomischen Transformanten in Tabak zu erwarten. Die Erfahrungen mit „knock-out“-Experimenten plastidärer Gene haben gezeigt, daß auf Gene, die für die Photosynthese notwendig sind, bei Wachstum der Pflanzen auf dem in der Gewebekultur verwendeten Medium problemlos verzichtet werden kann (Bock *et al.* 1999). Von den restlichen Genen des Plastoms haben sich nur zwei weitere (neben *ycf14*) als essentiell erwiesen: *ycf1* und *ycf2* (Drescher *et al.* 2000). Damit wäre es naheliegend anzunehmen, daß *ycf14* nur in jenen Spezies essentiell ist, in denen plastidäre Translation gebraucht wird, um die Produkte der essentiellen Gene *ycf1* und *ycf2* zu synthetisieren. In den Gräsern Gerste und Mais, von denen ribosomendefiziente Mutanten bekannt sind (z.B. Hess 1994-b), gibt es die beiden Gene *ycf1* und *ycf2* nicht im Plastom, damit bleiben keine essentiellen Gene (außer *ycf14*) mehr übrig, um die plastidäre Translation unerläßlich zu machen. Die Situation in Raps stellt sich allerdings etwas komplizierter dar. Bei diesem nahen Verwandten von *Arabidopsis* wurden Pflanzen mit defekten Ribosomen generiert, die nicht nur lebensfähig waren, sondern auch noch die defekten Ribosomen weitervererbten (Zubko & Day 1998 und 2002). Nun sind Sequenzinformationen zum Plastidenchromosom von Raps nur spärlich zu finden, lediglich ein kleiner Teil von *ycf2* wurde veröffentlicht (Blast, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>), so daß nicht klar ist, ob das Gen komplett und funktionell vorliegt. Bei dem Versuch, das *ycf1*-Gen zu sequenzieren (Helena Funk, persönliche Mitteilung), wurde bisher vom *trnN*-Gen ausgehend ca. 1.000 Bp in das *ycf1*-Gen hineingelesen, wobei sich lediglich 1 % der Basen von der *Arabidopsis*-Sequenz unterschieden. Es ist daher anzunehmen, daß Raps wie *Arabidopsis* über ein funktionelles *ycf1*-Gen verfügt. Natürlich ist es denkbar, daß sich Raps gerade auf einer Zwischenstufe befindet, in der *ycf1* und *ycf2* bereits im Kerngenom etabliert, aber noch nicht aus dem Plastom entfernt wurden, so daß bei Fehlen der plastidären Translation die entsprechenden Proteine aus dem Nukleus den Ausfall der plastidären kompensieren könnten. Eine eingehendere Untersuchung des Rapsgenoms könnte Belege für diese These erbringen.

Diskussionen zur RNA-Edierung

4.2.2 Diskussion der *ndhG*-Edierungsstelle

Da eine Edierungsstelle außerhalb eines Gens etwas sehr Ungewöhnliches ist – bisher nur ein weiteres Mal im Fall des *psbJ*-Gens von *Ginkgo biloba* beobachtet (Kudla & Bock 1999) – stellt sich die Frage nach ihrer Funktion. Im folgenden sind daher eine Reihe möglicher Erklärungen aufgelistet:

1. Unfall: In nur einem einzigen Fall wurde eine scheinbar sinnlose Edierungsstelle beschrieben: die Edierung einer dritten Kodonposition, die keine Änderung der Aminosäuresequenz zur Folge hat (Hirose *et al.* 1996). Dieser scheinbare Unfall erwies sich allerdings als speziesspezifisch, wobei im beschriebenen Beispiel mehrere Arten betroffen sind. Das spricht gegen einen Unfall, da er im Laufe der Evolution Zeit gehabt hätte, korrigiert statt konserviert zu werden. Es ist daher unwahrscheinlich, daß dem Phänomen keine Bedeutung zukommt. Abgesehen davon könnte im oben genannten Beispiel eine Feinregulierung erzielt werden, wenn unterschiedlich häufige tRNAs in der Translation zweier differierender Kodons für die gleiche Aminosäure zum Einsatz kämen. Es ist daher immer heikel, beobachtete Phänomene, für die zunächst keine Erklärung gefunden werden kann, als sinnlos abzutun.
2. Erkennungssequenz einer anderen Edierungsstelle: Es ist denkbar, daß die flankierende Sequenz der im Zuge dieser Arbeit untersuchten Edierungsstelle der Umgebung einer anderen Edierungsstelle ähnelt und spezifische *trans*-Faktoren damit interagieren könnten. Ein Vergleich der umliegenden Sequenzbereiche (± 40 Bp) sämtlicher bekannter Mais-edierungsstellen konnte dies allerdings nicht bestätigen. Man könnte höchstens von einer mitochondrialen Stelle ausgehen, da es denkbar wäre, daß ein für eine homologe Sequenz im Chondriom spezifischer Edierungsfaktor ein Transitpeptid für Plastiden erhalten haben könnte. Da die meisten kultivierten Gräser auch in ihrem Kerngenom polyploid sind oder dieses zumindest polyploider Herkunft ist (Soltis & Soltis 1995, Wendel 2000), liegen dort eine Reihe von Genen in mehreren Kopien vor. Genduplikationen haben oft eine Veränderung der Genfunktion oder des Wirkortes innerhalb der Zelle zur Folge, wobei mitunter aber auch lediglich eine Genkopie deletiert oder zum Pseudogen degradiert wird (Wendel 2000). Die Analyse des *Arabidopsis thaliana*-Kerngenoms zeigte die

Spezifitätsänderung der duplizierten RAR („repair and recombination“-)Gene und die Evolution neuer Funktionen bei zwei von fünf Photolyasehomologen, die nun als Blaulichtrezeptoren fungieren (Arabidopsis Genome Initiative 2000, Hoffman *et al.* 1996). Auch das in Kapitel 1.4.3 erwähnte „double targeting“ der NEP-Polymerasen vom Phagentyp (Hedtke *et al.* 2000) und einer Histidyl-tRNA-Synthetase (Akashi *et al.* 1998) beweist die Möglichkeit eines solchen Szenarios.

3. Veränderung der Sekundärstruktur: Im oben erwähnten Fall des *psbJ*-Gens von *Ginkgo biloba* befindet sich die Edierungsstelle in unmittelbarer Nähe zur Shine-Dalgarno-Sequenz (17 Bp stromaufwärts), so daß eine Veränderung der mRNA-Sekundärstruktur durch Edierung die Bindung der Ribosomen beeinflussen könnte (Kudla & Bock 1999). Es wird angenommen, daß in Plastiden (wie in Bakterien) die Bindung der Ribosomen stabilisierend auf Transkripte wirkt (Gruissem & Tonkyn 1993). Dies ist auch im Fall der *ndhG*-UTR denkbar, nur 10 Bp vor dem Start eines Gens ist mit wichtigen Regulationsfunktionen zu rechnen. Eine bestimmte Sekundärstruktur könnte zur Bindung der Ribosomen, eines mRNA-Stabilitätsfaktors oder zur Gewährleistung einer erfolgreichen Translation benötigter *trans*-Faktoren erforderlich sein (Eibl *et al.* 1999).

Verschiedene Beispiele belegen, daß die 5'-UTR eines Gens eine entscheidende Rolle bei der mRNA-Stabilität spielen kann. So konnte z.B. in *Chlamydomonas reinhardtii* gezeigt werden, daß vor dem *psbD*-Gen ein 74 Bp großer Bereich, der ein 47 kDa-Protein binden konnte, benötigt wird, um zu verhindern, daß die mRNA instabil wird (Nickelsen *et al.* 1994). In Transformationsexperimenten, in denen die 5'-UTR des *psbA*-Gens mit dem *uidA*-Gen fusioniert wurde, gab es lichtabhängige *uidA*-Transkription (Staub & Maliga 1994). Als die 5'-UTR des *rbcL*-Gens verwendet wurde, um das Markergen *uidA* zu stabilisieren, wurden zusätzlich 257 Bp des *rbcL*-Gens hierfür benötigt (Salvador *et al.* 1993). Auch die *Chlamydomonas* 5'-UTR von *petD* wurde mit *uidA* fusioniert und erwies sich als ausreichend für die Expression seines Genprodukts GUS (Sakamoto *et al.* 1994). In verschiedenen Ansätzen wurde diese 5'-UTR daraufhin deletiert, woraufhin in manchen Fällen die *uidA*-mRNA instabil wurde. In anderen Fällen wurde andererseits bei stabiler mRNA die Translatierbarkeit beeinträchtigt, obwohl die Shine-Dalgarno(SD)-ähnliche Sequenz intakt geblieben war. Das erinnert an die 5'-UTR des *Chlamydomonas rps7*-Gens, wo es zwar keine SD-ähnliche Sequenz gibt, aber die Bindung des eigenen Genprodukts, des S7-Proteins der kleinen ribosomalen Untereinheit, für die Translation benötigt wird (Fargo *et al.* 2001). Mutationen, die die Bindung durch Veränderung der

mRNA-Sekundärstruktur verhinderten, verursachten eine mRNA-Akkumulation, die nicht translatiert werden konnte. Desweiteren wurden dazu Suppressormutationen gefunden, die die Sekundärstruktur und damit die Translatierbarkeit wieder herstellen konnten. Die Bindung von *trans*-Faktoren an eine 5'-UTR wurde auch im Falle des *clpP*-Gens von Tabak nachgewiesen, wo durch Vermehrung der *clpP*-5'-UTR nach Chloroplastentransformation viele Kopien der 5'-UTR in Konkurrenz zueinander traten, was zu einer Verringerung der ClpP-Proteinmenge führte (Kuroda & Maliga 2002). Für diese Beobachtung ist die Bindung eines Faktors die wahrscheinlichste Erklärung.

Um zu überprüfen, ob ähnliches in dem in dieser Arbeit untersuchten Fall zutreffen könnte, wurde die Sekundärstruktur der Sequenz im edierten und unedierten Zustand *in silico* vorhergesagt („RNAfold“-Algorithmus), wo tatsächlich unterschiedliche Sekundärstrukturen gefunden wurden (siehe Abbildung 38). Bei *Sorghum bicolor*, bei dem, wie oben gezeigt, das Cytidin nicht ediert wird, ist, durch eine Sequenzdifferenz im Vergleich zu den anderen Gräsern 25 Bp stromaufwärts (siehe Abbildung 24), eine strukturelle Kompensation denkbar. *Sorghum bicolor* zeigt dort ein Thymidin, während alle anderen Gräser an dieser Stelle ein Adenosin besitzen. Es gibt ein Beispiel für eine Edierungsstelle, die durch eine Punktmutation in 20 Bp Entfernung inhibiert wird (Reed *et al.* 2001), so daß auch hier mit einem Zusammenhang zu rechnen ist. Es ist daher gut möglich, daß durch Edierung in der *ndhG*-5'-UTR die für die Bindung eines wichtigen *trans*-Faktors benötigte mRNA-Sekundärstruktur wieder hergestellt wird.

5. Kleines Peptid: Betrachtet man die Sequenzumgebung der Edierungsstelle in Mais und den anderen Gräsern, findet man die Möglichkeit eines kleinen Leserasters, dessen Stoppkodon mit dem *ndhG*-Startkodon durch Rasterverschiebung ein Adenosin teilt (siehe Abbildung 24). Es wäre denkbar, daß es sich dabei um ein kurzes Exon handelt, wie es z.B. vom Exon 1 des *petB*-Gens (6 Bp) oder vom Exon 1 des *petD*-Gens (8 Bp) von Mais bekannt ist (Barkan 1988). Das Stoppkodon und das Fehlen typischer Intron-Exon-Grenzmotive, wobei *trans*-Spleißen in Plastiden bisher nur in *Chlamydomonas* (Rivier *et al.* 2000) und *Marchantia* (Kohchi *et al.* 1988) beobachtet wurde, lassen ein kurzes ORF (offenes Leseraster) wahrscheinlicher erscheinen. Dieses putative 12 Aminosäuren lange Peptid (PEP12) ist bei den getesteten Gräsern mit Ausnahme von *Sorghum bicolor* hochkonserviert, das ein Stoppkodon an zweiter Position zeigt (siehe Abbildung 27). Auffälligerweise ist dies auch die einzige Art, die trotz Cytidin an der entsprechenden Position nicht ediert (siehe oben). In allen anderen Fällen würde RNA-Edierung das Kodon für Serin in das für Phenylalanin zurückverwandeln (siehe Abbildung 27-a). Bei *E. coli* wurde ein sogenanntes „Leader“-Peptid von 14 Aminosäuren Länge vor dem *trp*-Operon beschrieben, welches in die Regulierung der Attenuation involviert ist (Yanofsky 2000). Da aber die typische RNA-Struktur, die für den Prozess der Attenuation in Bakterien vonnöten ist, im Fall des *ndhG*-„Leaders“ nicht gewährleistet ist, ist eine vergleichbare Funktion sehr unwahrscheinlich. Es wurde aber eine Reihe von kleinen Peptiden bei Pflanzen beschrieben (zusammengefaßt bei Basrai *et al.* 1997, Überblick bei Bisseling 1999 oder Schaller 1999), die nicht aus größeren „Precursor“-Proteinen abgespalten werden, sondern schon als kleines Leseraster vorliegen, wie z.B. das Dekapeptid Labaditin in *Jatropha multifida* (Kosasi *et al.* 1989) oder das 12 Aminosäuren lange *Enod40* in *Sesbania rostrata* (Corich *et al.* 1998), welches wichtige Funktionen als Signalpeptid beim Wachstum, bei der Zellteilung und der Differenzierung inne hat (van de Sande *et al.* 1996, Charon *et al.* 1997 und 1999).

In den Westernexperimenten, die zum Nachweis der Existenz des putativen PEP12 unternommen wurden, konnte das Peptid *in vivo* nicht dargestellt werden (siehe Abbildung 28). Das schließt aber nicht aus, daß es exprimiert wird, da man bei einem derart kleinen Molekül davon ausgehen muß, daß es in den üblicherweise eingesetzten Proteinmengen nicht nachweisbar ist. Vergleicht man die Situation mit anderen Beispielen für kleine Peptide, erscheint dies gut möglich: Für die Isolation von Systemin mußten 28 kg Tomatenblattmaterial eingesetzt werden, um 1 µg Peptid anzureichern (Marx 1996). Abgesehen davon kann die Expression des Peptids auf bestimmte Gewebe oder

Entwicklungsphasen beschränkt sein und in den üblicherweise eingesetzten Blättern fehlen. Daher ist trotz fehlender Detektion diese Möglichkeit nicht auszuschließen.

4.2.2.1 Diskussion Shine-Dalgarno-Sequenz

Shine-Dalgarno(SD)-ähnliche Sequenzen vor Plastidengenomen sind, sofern vorhanden, variabler, was die Lokalisation, Größe und Sequenz angeht, als bakterielle Shine-Dalgarno-Sequenzen (Ruf & Kössel 1988, Bonham-Smith & Bourque 1989). Aus dem „Alignment“ des *ndhG*-„Leader“-Bereichs (siehe Abbildung 24) ist ersichtlich, daß die mutmaßliche plastidäre Ribosomenbindestelle mit wenigen Punktmutationen aus dem cyanobakteriellen Vorläufer entstanden ist. Natürlich könnte sie damit ihre Funktion verloren haben, was z.B. Sugiura *et al.* (1998) vorschlugen. Mutationen der SD-ähnlichen Sequenz des *petD*-Gens von *Chlamydomonas reinhardtii* z.B. behinderten die Translation nicht (Sakamoto *et al.* 1994). Ebenso zeigten Mutationen vor dem *atpH*-Gen von *Euglena gracilis* kaum Effekte auf die *in vitro*-Translationsinitiation (Betts & Spemulli 1994). Hirose und Sugiura fanden (1996) drei potentielle Ribosomenbindestellen in der 5'-UTR des *psbA*-Gens von Tabak, von denen eine vom SD-ähnlichen Typ war; jedoch konnte nur für die beiden anderen *in vitro* gezeigt werden, daß sie für die Translation von Bedeutung waren. In verschiedenen Ansätzen wurden 5'-UTRs von vier verschiedenen *Chlamydomonas reinhardtii*-Genen (*atpB*, *atpE*, *rps4* und *rps7*) mit *aadA* und *uidA* fusioniert. Nach Mutation der SD-ähnlichen Sequenzen konnte in den transformierten Chloroplasten kein negativer Effekt auf die Translation der Reportergene festgestellt werden (Fargo *et al.* 1998).

Trotzdem liegt die SD-ähnliche Sequenz hochkonserviert in allen Plastomen vor, und es gibt auch Gegenbeispiele, die eine essentielle Funktion vermuten lassen: Deletion der SD-ähnlichen Sequenz in der *psbA*-5'-UTR von *Chlamydomonas* hemmte die Translation (Mayfield *et al.* 1994), und auch die Translation der Tabak-*rps14*-mRNA ist in einem *in vitro*-Translationssystem von dieser Sequenz abhängig (Hirose *et al.* 1998), ebenso wie die der Gene *rbcL* und *atpE* (Sugiura *et al.* 1998).

Da sich kein einheitliches Bild zeigt, muß man davon ausgehen, daß die Funktion der SD-ähnlichen Sequenz in einigen Fällen durch andere Bereiche ersetzt wurde, während sie in anderen Fällen noch funktionell zu sein scheint. Die Ergebnisse der Sequenzierung verschiedener Vertreter von 7 Monokotyledonenordnungen bestätigen, daß die Shine-Dalgarno-ähnliche Sequenz auch im Falle des *ndhG*-Gens hochkonserviert vorliegt.

4.2.3 Diskussion der Maismutanten

Die Entwicklung der Partikelkanone im Jahr 1987 (Klein *et al.* 1987) ermöglichte es, Tabakplastiden gezielt genetisch zu verändern (Svab *et al.* 1990, Staub & Maliga 1992, Maliga *et al.* 1993 und 1994). So gelang es, mittels reverser Genetik die Funktionen der meisten offenen Leseraster aufzuklären (unter anderen *ycf3* – Ruf *et al.* 1997, *ycf6* – Hager *et al.* 1999, *ycf9* – Ruf *et al.* 2000 und Swiatek *et al.* 2001). Inzwischen ist es sogar gelungen, diese Methode für zwei weitere Landpflanzenspezies zu etablieren: Die Kartoffel (Sidorov *et al.* 1999) und die Tomate (Ruf *et al.* 2001). Da es im Plastidengenom bisher keinen Kandidaten für einen möglichen Edierungsfaktor gibt, und kaum noch offene Leseraster als mögliche Kandidaten zur Verfügung stehen, lag die Vermutung nahe, von kernkodierten Faktoren ausgehen zu müssen. Dabei wird es sowohl allgemeine als auch spezifische Faktoren geben, was das im Zuge der vorliegenden Arbeit gezeigte Beispiel bestätigt, wo nicht alle Edierungsstellen des Plastoms durch eine Kernmutation beeinträchtigt werden (siehe Tabelle 11).

Schon früher wurden kernkodierte Edierungsfaktoren postuliert. So wurde RNA-Edierung unabhängig von der plastidären Translation gefunden: In der Ribosomen-defizienten Gerstenmutanten *albostrians* (Zeltz *et al.* 1993) und in durch Spectinomycin gehemmten Tabakchloroplasten (Karcher & Bock 1998). Eine Edierungsstelle aus Spinat (*psbL*) konnte im Kernhintergrund von Tabak nicht ediert werden (Bock *et al.* 1994), ebenso erging es einer Edierungsstelle aus Mais (*rpoB-IV*, Reed & Hanson 1997). Eine andere Maisedierungsstelle (*rpoB-I*) trat in Konkurrenz zur bereits in Tabak vorhandenen und verringerte die Edierungsrate (Reed & Hanson 1997). Ebenso kann das Vorhandensein mehrerer Kopien der selben Edierungsstelle zur Limitierung der *trans*-Faktoren führen, was im Fall der Stelle im *psbL*-Gen getestet wurde (Chaudhuri *et al.* 1995). Diese Stelle wurde später ausführlicher untersucht (Bock & Koop 1997): Tabakprotoplasten der Mutantenlinien wurden mit Spinatprotoplasten fusioniert, wodurch die Edierungskapazität aber nur bis zu 25 % wieder hergestellt werden konnte, was wahrscheinlich auf die Konkurrenz der vorhandenen Spinatchloroplasten zurückzuführen ist, deren Importmaschinerie möglicherweise den den Tabakchloroplasten fremden Faktor zuverlässiger befördert.

Überraschende Ergebnisse lieferte eine weitere Spinatedierungsstelle (*ndhA*), die ins Tabakplastom integriert wurde: Die Edierungsstelle, die im Tabakplastom sonst nicht vorhanden ist, kann in diesem Beispiel ediert werden. Im Fall des allotetraploiden Tabaks sind nämlich vom „Vater“ *Nicotiana tomentosiformis* noch *trans*-Faktoren für Edierungsstellen vorhanden, die von den Plastiden, die von der „Mutter“ *Nicotiana sylvestris* abstammen, nicht mehr benötigt werden (Schmitz-Linneweber *et al.* 2001-b).

Die Untersuchungen an den Mutator-induzierten Maismutanten sollten dazu führen, einen solchen spezifischen, kernkodierten, plastidären Edierungsfaktor zu isolieren und zu charakterisieren. Alle Mutantensamen vom Typ C34-1/-4, die ausgesät wurden, zeigten aber keine wie für ein Kerngen zu erwartende, mendelnde Vererbung, was es leider unmöglich machte, ein verantwortliches Gen zu lokalisieren. So erbrachten die Versuche zwar einen weiteren Hinweis auf das Vorhandensein kernkodierter Edierungsfaktoren, nicht aber einen Faktor selbst.

5 Zusammenfassung

Im Laufe der Evolution vom Cyanobakterium zur Plastide war die auffälligste Veränderung, abgesehen von der Morphologie, die drastische Reduktion der Genomkapazität: Von durchschnittlich ca. 3.500 Genen bei frei lebenden Cyanobakterien sind nur noch um die 110 (200 – 300 bei manchen Algen) erhalten geblieben (Martin & Herrmann 1998, Martin *et al.* 1998, Simpson & Stern 2002).

Entgegen dem Verlusttrend gibt es allerdings eine Reihe neuer Eigenschaften, die wahrscheinlich im Laufe der Plastidenevolution hinzu gewonnen wurden: RNA-Edierung, Verbreitung von Introns, die nukleär kodierte RNA-Polymerase der Plastiden (NEP) und einige wenige Gene unbekannter Herkunft (*ycf1/2/14/15*).

Mittels reverser Genetik gelang es, die Funktionen der meisten plastidären, offenen Leseraster aufzuklären (unter anderen *ycf3* – Ruf *et al.* 1997, *ycf6* – Hager *et al.* 1999, *ycf9* - Ruf *et al.* 2000 und Swiatek *et al.* 2001). Bemerkenswerterweise sind gerade die oben erwähnten Gene (*ycf1/2/14/15*) bei Prokaryoten bislang nicht nachgewiesen.

Im Laufe der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen bezüglich zwei dieser wahrscheinlich im Lauf der Plastidenevolution neu hinzu gekommenen Gene unternommen: *ycf1* und *ycf14*.

Ein „knock-out“-Ansatz des extrem schwach exprimierten *ycf1* im Vorfeld der vorliegenden Arbeit erbrachte schon sehr früh ein stabiles Gleichgewicht zwischen Wildtyp- und transformiertem Genom, was auch auf nicht-selektivem Medium nicht zu entmischen war. Daher mußte davon ausgegangen werden, daß es sich bei *ycf1* um ein essentielles Gen handelt (Drescher *et al.* 2000). Da mit der Strategie der reversen Genetik neben der Beobachtung kleiner morphologischer Veränderungen (Kapitel 3.1.2) und ungewöhnlichen Genomgrößen in der PFGE (Kapitel 3.1.4) keine weiteren Erkenntnisse gewonnen werden konnten, wurde im Zuge der vorliegenden Arbeit der *ycf1*-Promotor durch den stark exprimierenden und durch Blaulicht induzierten *psbD*-Promotor ausgetauscht. Eine so erzwungene Überexpression von *ycf1* zeigte allerdings keinen Effekt.

Parallel dazu wurde ein Stück des *ycf1*-Gens in *E.coli* überexprimiert, um ein Antiserum gegen Ycf1 zu erhalten. Mit Hilfe dieses Serums konnte zum einen gezeigt werden, daß sich die schwache Genexpression auch im Proteingehalt widerspiegelt, wobei in jungem Gewebe ein etwas höherer Level, sowohl auf RNA- als auch Proteinebene, beobachtet werden konnte. Zusammen mit den Daten aus der PFGE unterstützte dies letztendlich die Annahme, Ycf1 könnte bei der Plastidenreplikation eine Rolle spielen (siehe Kapitel 4.1.2).

Das *ycf14*-Gen befindet sich im Intron des *trnK*-Gens und weist Homologie zu mitochondrialen Intronmaturasen auf. Der in der vorliegenden Arbeit vorgestellte „knock-out“-Ansatz stellte in diesem Spezialfall das Entfernen des kompletten *trnK*-Introns dar. Wäre *ycf14* lediglich für das Spleißen des eigenen Introns vonnöten, wären problemlos Transformanten zu erhalten. Da aber keine homoplastomischen Linien gewonnen werden konnten, muß davon ausgegangen werden, daß das *ycf14*-Gen eine andere bzw. weitere essentielle Funktion inne hat (siehe Kapitel 4.2.1).

Als Beitrag zur Erforschung der ebenfalls evolutionär recht neuen RNA-Edierung wurde eine Edierungsstelle im nichtkodierenden Bereich vor dem *ndhG*-Gen einiger Monokotyledonen phylogenetisch untersucht und mit Hilfe von Transposon-induzierten Maismutanten nach nukleär kodierter Edierungsfaktoren gesucht.

Da eine Edierungsstelle außerhalb eines Gens, wie die im Laufe der vorliegenden Arbeit untersuchte (im 5'-UTR des *ndhG*-Gens), etwas sehr Ungewöhnliches ist – bisher nur ein weiteres Mal im Fall des *psbJ*-Gens von *Ginkgo biloba* beobachtet (Kudla & Bock 1999) – wurde, nachdem ihre Entstehung im Stammbaum der Monokotyledonen eingeordnet worden war, ihre mögliche Funktion ausführlich diskutiert (siehe Kapitel 4.2.2). Beim Sequenzvergleich fiel auf, daß die konservierte Sequenz bei den Gräsern unmittelbar vor dem *ndhG*-Gen, für ein kurzes Peptid (PEP12) kodieren könnte. Im Zuge dieser Arbeit wurde daher mit einer Reihe von Westernanalysen versucht, das Peptid *in vivo* nachzuweisen. Daß es tatsächlich exprimiert wird, konnte allerdings nicht dargestellt werden. Da man beispielsweise bei einem Signalpeptid davon ausgehen muß, daß es möglicherweise in den üblicherweise eingesetzten Proteinmengen nicht nachweisbar ist, konnte die Existenz des Peptids damit jedoch auch nicht ausgeschlossen werden.

In einigen Linien von durch das Mutator-Transposon induzierten Maismutanten war das Fehlen von Edierung der Edierungsstelle des *petB*-Gens beobachtet worden. Im Laufe der vorliegenden Arbeit wurden eine Reihe von Aussaaten auf Edierungsrate und Fluoreszenzverhalten hin getestet. In Einzelfällen wurden zusätzlich Auswirkungen auf das Transkriptionsmuster und andere Edierungsstellen untersucht. Die ausgesäten Linien zeigten allerdings keine wie für ein Kerngen zu erwartende, mendelnde Vererbung, was es leider unmöglich machte, ein verantwortliches Gen zu lokalisieren. So erbrachten die Versuche zwar einen weiteren Hinweis auf das Vorhandensein kernkodierter spezifischer Edierungsfaktoren, nicht aber einen Faktor selbst.

6 Literatur

6.1 Literaturverzeichnis

- Akashi, K., Grandjean, O. & Small, I. (1998).** Potential dual targeting of an *Arabidopsis* archaeobacterial-like histidyl-tRNA synthetase to mitochondria and chloroplasts. *FEBS Letters* **431**, 39-44.
- Allison, L. A. & Maliga, P. (1995).** Light-responsive and transcription-enhancing elements regulate the plastid *psbD* core promoter. *EMBO J* **14**, 3721-3730.
- Allison, L. A., Simon, L. D. & Maliga P. (1996).** Deletion of *rpoB* reveals a second distinct transcription system in plastids of higher plants. *EMBO J* **15**, 2802-2809.
- Altmann, R. (1890).** Elementarorganismen. In: Die Genese der Zellen. Viet und Co., Leipzig.
- Anand, R. (1986).** Pulsed field gel electrophoresis: A technique for fractionating large DNA molecules. *Trends Genet* **2**, 278-283.
- Angiosperm Phylogeny Group (1998).** An ordinal classification for the families of flowering plants. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **80**, 531-553.
- Arabidopsis Genome Initiative (2000).** Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**, 796-815.
- Arnon, D. I. (1949).** Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenyloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol* **24**, 1-15.
- Ayliffe, M. A., Scott, N. S. & Timmis, J. N. (1998).** Analysis of plastid DNA-like sequences within the nuclear genomes of higher plants. *Mol Biol Evol* **15**, 738-745.
- Barkan, A., Miles, D. & Taylor W.C. (1986).** Chloroplast gene expression in nuclear, photosynthetic mutants of maize. *EMBO J* **5**, 1421-1427.
- Barkan, A. (1988).** Proteins encoded by a complex chloroplast transcription unit are each translated from both monocistronic and polycistronic mRNAs. *EMBO J* **7**, 2637-2644.
- Barkan, A. (1989).** Tissue-dependent plastid RNA splicing in Maize: transcripts from four plastid genes are predominantly unspliced in leaf meristems and roots. *Plant Cell* **1**, 437-445.
- Barkan, A., Walker, M., Nolasco, M. & Johnson, D. (1994).** A nuclear mutation in maize blocks the processing and translation of several chloroplast mRNAs and provides evidence for the differential translation of alternative mRNA forms. *EMBO J* **13**, 3170-3181.
- Barkan, A. & Goldschmidt-Clermont, M. (2000).** Participation of nuclear genes in chloroplast gene expression. *Biochimie* **82**, 559-572.

- Basrai, M. A., Hieter, P. & Boeckle, J. D. (1997).** Small open reading frames: Beautiful needles in the haystack. *Genome Research* **7**, 768-771.
- Bendich, A. J. (1987).** Why do chloroplasts and mitochondria contain so many copies of their genome. *BioEssays* **6**, 279-282.
- Benne, R., Van den Burg, J., Brakendhoff, J. P. J., Sloof, P., Van Boom, J. H. & Tromp, M. C. (1986).** Major transcript of the frameshift *coxII* gene from trypanosome mitochondria contains four nucleotides that are not encoded in the DNA. *Cell* **46**, 819-826.
- Besendahl, A., Qui, Y.-L., Lee, J., Palmer, J. D. & Bhattacharya, D. (2000).** The cyanobacterial origin and vertical transmission of the plastid tRNA^{Leu} group-I intron. *Curr Genet* **37**, 12-23.
- Betts, L. & Spremulli, L. L. (1994).** Analysis of the role of the Shine-Dalgarno sequence and mRNA secondary structure on the efficiency of translational initiation in the *Euglena gracilis* chloroplast *atpH* mRNA. *JBC* **269**, 26456-26463.
- Birnboim, H. C. & Doly, J. (1979).** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *NAR* **7**, 1513-1523.
- Bisseling, T. (1999).** The role of plant peptides in intercellular signalling. *Current Opinion in Plant Biology* **2**, 365-368.
- Blake, M. S., Johnston, K. H., Russell-Jones, G. J. & Gotschlich, E. C. (1984).** A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on Western blots. *Anal Biochem* **136**, 175-179.
- Blanchard, J. L. & Schmidt, G. W. (1995).** Pervasive migration of organellar DNA to the nucleus in plants. *Journal of Molecular Evolution* **41**, 397-406.
- Bligny, M., Courtois, F., Thamini, S., Chang, C. C., Lagrange, T., Baruah-Wolff, J., Stern, D. & Lerbs-Mache, S. (2000).** Regulation of plastid rDNA transcription of CDF2 with two different RNA polymerases. *EMBO J* **19**, 1851-1860.
- Blum, H., Beier, H. & Gross, H. (1987).** Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamid gels. *Electrophoresis* **8**, 93-99.
- Bock, R., Hagemann, R., Kössel, H. & Kudla, J. (1993).** Tissue- and stage-specific modulation of RNA editing of the *psbF* and *psbL* transcript from spinach plastids - a new regulatory mechanism? *MGG* **240**, 238-244.
- Bock, R., Kössel, H. & Maliga, P. (1994).** Introduction of a heterologous editing site into the tobacco plastid genome: the lack of RNA editing leads to a mutant phenotype. *EMBO J* **13**, 4623-4628.
- Bock, R., Hermann, M. & Kössel, H. (1996).** *In vivo* dissection of *cis*-acting determinants for plastid RNA editing. *EMBO J* **15**, 5052-5059.

- Bock, R. & Koop, H.-U. (1997).** Extraplastidic site-specific factors mediate RNA editing in chloroplasts. *EMBO J* **16**, 3282-3288.
- Bock, R., Hermann, M. & Fuchs, M. (1997).** Identification of critical nucleotide positions for plastid RNA editing site recognition. *RNA* **3**, 1194-1200.
- Bock, R., Drescher, A. & Ruf, S. (1999).** Reverse genetics in higher plants. In: *Endocytobiology VII (From Symbiosis to Eukaryotism)*. Wagner, E. *et al.* (eds.), 427-437.
- Bonham-Smith, P. C. & Bourque, D. P. (1989).** Translation of chloroplast-encoded mRNA: potential initiation and termination signals. *NAR* **17**, 2057-2080.
- Börner, G. V., Mörl, M., Wissinger, B., Brennicke, A. & Schmelzer, C. (1995).** RNA editing of a group II intron in *Oenothera* as a prerequisite for splicing. *MGG* **246**, 739-744.
- Boudreau, E., Turmel, M., Goldschmidt-Clermont, M., Rochaix, J.-D., Sivan, S., Michaels, A. & Leu, S. (1997).** A large open reading frame (ORF 1995) in the chloroplast DNA of *Chlamydomonas reinhardtii* encodes an essential protein. *MGG* **253**, 649-653.
- Boynton, J. E., Gilham, N. W., Harris, E. H., Hosler, J. P., Johnson, A. M., Jones, A. R., Randolph-Anderson, B. L., Robertson, D., Klein, T. M., Shark, K. B. & Sanford, J. C. (1988).** Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity microprojectiles. *Science* **240**, 1534-1538.
- Bradford, M. (1976).** A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
- Cannon, G., Heinhorst, S., Siedlecki, J. & Weissbach, A. (1985).** Chloroplast DNA synthesis in light and dark grown cultured *Nicotiana tabacum* cells as determined by molecular hybridization. *Plant Cell Reports* **4**, 41-45.
- Casano, L. M., Zapata, J. M., Martin, M. & Sabater, B. (2000).** Chlororespiration and poisoning of cyclic electron transport. *JBC* **275**, 942-948.
- Cavalier-Smith, T. (1991).** Intron phylogeny: a new hypothesis. *Trends Genet* **7**, 145-148.
- Cavalier-Smith, T. & Chao, E. E. (1996).** Molecular phylogeny of the free-living archaeozoan *Trepomonas agilis* and the nature of the first eukaryote. *Journal of Molecular Evolution* **43**, 551-562.
- Cerutti, H., Johnson, A. M., Boynton, J. E. & Gillham, N. W. (1995).** Inhibition of chloroplast DNA recombination and repair by dominant negative mutants of *Escherichia coli* RecA. *Mol Cell Biol* **15**, 3003-3011.

- Charon, C., Johansson, C., Kondorosi, E., Kondorosi, A. & Crespi, M. (1997).** *enod40* induces dedifferentiation and division of root cortical cells in legumes. PNAS **94**, 8901-8906.
- Charon, C., Sousa, C., Crespi, M. & Kondorosi, A. (1999).** Alteration of *enod40* expression modifies *Medicago truncatula* root nodule development induced by *Sinorhizobium meliloti*. Plant Cell **11**, 1953-1965.
- Chaudhuri, S., Carrer, H. & Maliga, P. (1995).** Site-specific factor involved in the editing of the *psbL* mRNA in tobacco plastids. EMBO J **14**, 2951-2957.
- Chen, E. Y. & Seeburg, P. H. (1985).** Supercoil sequencing: A fast and simple method for sequencing plasmid DNA. DNA **4**, 165-170.
- Christopher, D. A., Kim, K. & Mullet, J. E. (1992).** A novel light-regulated promoter is conserved in cereal and dicot chloroplasts. Plant Cell **4**, 785-798.
- Christopher, D. A. & Hoffer, P. H. (1998).** DET1 represses a chloroplast blue light-responsive promoter in a developmental and tissue-specific manner in *Arabidopsis thaliana*. Plant J **14**, 1-11.
- Christopher, D. A., Shen, Y., Dudley, P. & Tsinoremas, N. F. (1999).** Expression of a higher-plant *psbD* promoter in a cyanobacterium (*Synechococcus* sp. strain PCC7942) reveals a conserved cis-element, designated PGT, that differentially interacts with sequence-specific binding factors during leaf development. Curr Genet **35**, 657-666.
- Chu, G., Vollrath, D. & Davis, R. W. (1986).** Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric fields. Science **234**, 1582-1585.
- Cohen, S. N., Chang, A. C. Y. & Hsu, L. (1972).** Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of *Escherichia coli* by R factor DNA. PNAS **69**, 2110-2114.
- Corich, V., Goormachtig, S., Lievens, S., Van Montagu, M. & Holsters, M. (1998).** Patterns of ENOD40 gene expression in stem-borne nodules of *Sesbania rostrata*. Plant Mol Biol **37**, 67-76.
- Cousineau, B., Lawrence, S., Smith, D. & Belfort, M. (2000).** Retrotransposition of a bacterial group II intron. Nature **404**, 1018-1021.
- Curcio, M. J. & Belfort, M. (1996).** Retrohoming: cDNA-Mediated Mobility of Group II Introns Requires a Catalytic RNA. Cell **84**, 9-12.
- Davis, B. J. (1964).** Disk electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. Annals of the New York Academy of Sciences **121**, 404-427.
- Davies, J. & Jacob, F. (1968).** Genetic mapping of the regulator and operator genes of the *lac* operon. J Mol Biol **36**, 413-417.

- Deininger, P. L. (1983).** Approaches to rapid DNA sequence analysis. *Anal Biochem* **135**, 247-263.
- De Las Rivas, J., Lozano, J. J. & Ortiz, A. R. (2002).** Comparative analysis of chloroplast genomes: functional annotation, genome-based phylogeny, and deduced Evolutionary patterns. *Genome Research* **12**, 567-583.
- Del Campo, E. M., Sabater, B. & Martin, M. (2000).** Transcripts of the *ndhH-D* operon of barley plastids: possible role of unedited site III in splicing of the *ndhA* intron. *NAR* **28**, 1092-1098.
- Del Campo, E. M., Sabater, B. & Martin, M. (2002).** Post-transcriptional control of chloroplast gene expression. Accumulation of stable *psaC* mRNA is due to downstream RNA cleavages in the *ndhD* gene. *JBC* **277**, 36457-36464.
- Delwiche, C. F., Kuhsel, M. & Palmer, J. D. (1995).** Phylogenetic analysis of *tufA* sequences indicates a cyanobacterial origin of all plastids. *Molecular Phylogenetics & Evolution* **4**, 110-128.
- De Moreno, M. R., Smith, J. F. & Smith, R. V. (1985).** Silver staining of proteins in polyacrylamide gels: increased sensitivity through a combined Coomassie blue-silver stain procedure. *Anal Biochem* **151**, 466-470.
- dePamphilis, C. W. & Palmer, J. D. (1990).** Loss of photosynthetic and respiratory genes from the plastid genome of a parasitic flowering plant. *Nature* **348**, 337-339.
- DeSantis-Maciossek, G., Kofer, W., Bock, A., Schoch, S., Maier, R. M., Wanner, G., Rüdiger, W., Koop, H.-U. & Herrmann, R. G. (1999).** Targeted disruption of the plastid RNA polymerase genes *rpoA*, *B* and *C1*: molecular biology, biochemistry and ultrastructure. *Plant J* **18**, 477-489.
- Deshpande, N. N., Hollingsworth, M. & Herrin, D. L. (1995).** The *atpF* group-II intron-containing gene from spinach chloroplasts is not spliced in transgenic *Chlamydomonas* chloroplasts. *Curr Genet* **28**, 122-127.
- Doyle, J. J. & Doyle, L. (1990).** Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* **12**, 13-15.
- Drescher, A., Ruf, S., Calsa, T., Carrer, H. & Bock, R. (2000).** The two largest chloroplast genome-encoded open reading frames of higher plants are essential genes. *Plant J* **22**, 97-104.
- Drescher, A., Hupfer, H., Nickel, C., Albertazzi, F., Hohmann, U., Herrmann, R. G. & Maier, R. M. (2002).** C-to-U conversion in the intercistronic *ndhI/ndhG* RNA of plastids from monocot plants: conventional editing in an unconventional small reading frame? *MGG* **267**, 262-269.
- Dretzen, G., Bellard, M., Sassone-Corsi, P. & Chambon, P. (1981).** A reliable method for the recovery of DNA fragments from agarose and acrylamide gels. *Anal Biochem* **112**, 295-298.

- du Jardin, B. D., Kuhlanek, D. J. & Barkan, A. (1994).** Expression of intron-encoded maturase-like polypeptides in potato chloroplasts. *Curr Genet* **25**, 158-163.
- Edwards, K. & Kössel, H. (1981).** The rRNA operon from *Zea mays* chloroplasts: nucleotide sequence of 23S rDNA and its homology with *E.coli* 23S rDNA. *NAR* **9**, 2853-2869.
- Eibl, C., Zou, Z., Beck, A., Kim, M., Mullet, J. & 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**, 333-345.
- Ellis, J. (1982).** Promiscuous DNA - chloroplast genes inside plant mitochondria. *Nature* **299**, 678-679.
- Ems, S. C., Morden, C. W., Dixon, C. K., Wolfe, K. H., dePamphilis, C. W. & Palmer, J. D. (1995).** Transcription, splicing and editing of plastid RNAs in the nonphotosynthetic plant *Epifagus virginiana*. *Plant Mol Biol* **29**, 721-733.
- Faivre-Nitschke, S. E., Grienenberger, J. M. & Gualberto, J. M. (1999).** A prokaryotic-type cytidine deaminase from *Arabidopsis thaliana* - Gene expression and functional characterization. *European Journal of Biochemistry* **263**, 896-903.
- Fargo, D. C., Zhang, M., Gilliam, N. W. & Boynton, J. E. (1998).** Shine-Dalgarno-like sequences are not required for translation of chloroplast mRNAs in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts or *Escherichia coli*. *MGG* **257**, 271-282.
- Fargo, D. C., Boynton, J. E. & Gillham, N. W. (2001).** Chloroplast ribosomal protein S7 of *Chlamydomonas* binds to chloroplast mRNA leader sequences and may be involved in translation initiation. *Plant Cell* **13**, 207-218.
- Feinberg, A. P. & Vogelstein, B. (1983).** A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* **132**, 6-13.
- Feinberg, A. P. & Vogelstein, B. (1984).** A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Addendum. *Anal Biochem* **137**, 266-267.
- Ferat, J.-L. & Michel, F. (1993).** Group II self-splicing introns in bacteria. *Nature* **364**, 358-361.
- Freyer, R., Hoch, B., Neckermann, K., Maier, R. M. & Kössel, H. (1993).** RNA editing in maize chloroplasts is a processing step independent of splicing and cleavage to monocistronic mRNAs. *Plant J* **4**, 621-629.
- Freyer, R., López, C., Maier, R. M., Martin, M., Sabater, B. & Kössel, H. (1995).** Editing of the chloroplast *ndhB* encoded transcript shows divergence between closely related members of the grass family (Poaceae). *Plant Mol Biol* **29**, 679-684.

- Freyer, R., Kiefer-Meyer, M.-C. & Kössel, H. (1997).** Occurrence of plastid RNA editing in all major lineages of land plants. *PNAS* **94**, 6285-6290.
- Fujiwara, M., Nagashima, A., Kanamaru, K., Tanaka, K. & Takahashi, H. (2000).** Three new nuclear genes, *sigD*, *sigE* and *sigF*, encoding putative plastid RNA polymerase σ factors in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters* **482**, 47-52.
- Fuse, S. & Tamura, M. N. (2000).** A phylogenetic analysis of the plastid *matK* gene with emphasis on Melanthiaceae *sensu lato*. *Plant Biology* **2**, 415-427.
- Gamble, P. E., Sexton, T. B. & Mullet, J. E. (1988).** Light-dependent changes in *psbD* and *psbC* transcripts of barley chloroplasts: accumulation of two transcripts maintains *psbD* and *psbC* translation capability in mature chloroplasts. *EMBO J* **7**, 1288-1297.
- Gamble, P. E. & Mullet, J. E. (1989).** Blue light regulates the accumulation of two *psbD-psbC* transcripts in barley chloroplasts. *EMBO J* **8**, 2785-2794.
- Giege, P. & Brennicke, A. (1999).** RNA editing in *Arabidopsis* mitochondria effects 441 C to U changes in ORFs. *PNAS* **96**, 15324-15329.
- Giovannoni, S. J., Turner, S., Olsen, G. J., Barns, S., Lane, D. J. & Pace, N. R. (1988).** Evolutionary relationships among cyanobacteria and green chloroplasts. *J Bacteriol* **170**, 3584-3592.
- Girvitz, S. C., Bacchetti, S., Rainbow, A. J. & Graham, F. L. (1980).** A rapid and efficient procedure for the purification of DNA from agarose gels. *Anal Biochem* **106**, 492-496.
- Gottesman, S., Halpern, E. & Trisler, P. (1981).** Role of *sulA* and *sulB* in filamentation by Lon mutants of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **148**, 265-273.
- Graf, L., Kössel, H. & Stutz, E. (1980).** Sequencing of 16S-23S spacer in a ribosomal RNA operon of *Euglena gracilis* chloroplast DNA reveals two tRNA genes. *Nature* **286**, 908-910.
- Gray, M. W. (1989).** The evolutionary origins of organelles. *Trends Genet* **5**, 294-299.
- Gruissem, W. (1989).** Chloroplast gene expression: how plants turn their plastids on. *Cell* **56**, 161-170.
- Gruissem, W. & Tonkyn, J. C. (1993).** Control mechanisms of plastid gene expression. *Critical Reviews in Plant Sciences* **12**, 19-55.
- Hager, M., Biehler, K., Illerhaus, J., Ruf, S. & Bock, R. (1999).** Targeted inactivation of the smallest plastid genome-encoded reading frame reveals a novel and essential subunit of the cytochrome *b₆f* complex. *EMBO J* **18**, 5834-5842.
- Hajdukiewicz, P. T. J., Allison, L. A. & Maliga, P. (1997).** The two RNA polymerases encoded by the nuclear and the plastid compartments transcribe distinct groups of genes in tobacco plastids. *EMBO J* **16**, 4041-4048.

- Hanahan, D. (1983).** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557-580.
- Hanahan, D., Jessee, J. & Bloom, F. R. (1991).** Plasmid transformation of *E. coli* and other bacteria. *Methods Enzymol* **204**, 63-113.
- Hedrick, L. A., Heinhorst, S. White, M. A. & Cannon, G. C. (1993).** Analysis of soybean chloroplast DNA replication by two-dimensional gel electrophoresis. *Plant Mol Biol* **23**, 779-792.
- Hedtke, B., Börner, T. & Weihe, A. (1997).** Mitochondrial and chloroplast phage-type RNA polymerases in *Arabidopsis*. *Science* **277**, 809-811.
- Hedtke, B., Meixner, M., Gillandt, S., Richter, E., Börner, T. & Weihe, A. (1999).** Green fluorescent protein as a marker to investigate targeting of organellar RNA polymerases of higher plants *in vivo*. *Plant J* **17**, 557-561.
- Hedtke, B., Börner, T. & Weihe, A. (2000).** One RNA polymerase serving two genomes. *EMBO Reports* **1**, 435-440.
- Heinhorst, S., Cannon, G. C. & Weissbach, A. (1985).** Plastid and nuclear DNA synthesis are not coupled in suspension cells of *Nicotiana tabacum*. *Plant Mol Biol* **4**, 3-12.
- Herrmann, R. G. (1997).** Eukaryotism, Towards a New Interpretation.
In: *Eukaryotism and Symbiosis*. Schenk, H. E. A., Herrmann, R. G., Jeon, K. W., Müller, N. E., Schwemmler, W. (eds.), Springer, Heidelberg, 73-118.
- Herrmann, M. & Bock, R. (1999).** Transfer of plastid RNA-editing activity to novel sites suggests a critical role for spacing in editing-site recognition. *PNAS* **96**, 4856-4861.
- Hess, W. R., Prombona, A., Fieder, B., Subramanian, A. R. & Börner T. (1993).** Chloroplast *rps15* and the *rpoB/C1/C2* gene cluster are strongly transcribed in ribosome-deficient plastids: evidence for a functioning non-chloroplast-encoded RNA polymerase. *EMBO J* **12**, 563-571.
- Hess, W. R., Hoch, B., Zeltz, P., Hübschmann, T., Kössel, H. & Börner, T. (1994-a).** Inefficient *rpl2* Splicing in Barley Mutants with Ribosome-Deficient Plastids. *Plant Cell* **6**, 1455-1465.
- Hess, W. R., Hübschmann, T. & Börner, T. (1994-b).** Ribosome-deficient plastids of *albostrians* barley: Extreme representatives of non-photosynthetic plastids. *Endocytobiosis & Cell Research* **10**, 65-80.
- Hilu, K. W. & Alice, L. A. (1999).** Evolutionary implications of *matK* indels in poaceae. *American Journal of Botany* **86**, 1735-1741.
- Hirose, T., Wakasugi, T., Sugiura, M. & Kössel, H. (1994).** RNA editing of tobacco *petB* mRNAs occurs both in chloroplasts and non-photosynthetic proplastids. *Plant Mol Biol* **26**, 509-513.

- Hirose, T., Fan, H., Suzuki, J. Y., Wakasugi, T., Tsudzuki, T., Kössel, H. & Sugiura, M. (1996).** Occurrence of silent RNA editing in chloroplasts: its specificity and the influence of environmental and developmental conditions. *Plant Mol Biol* **30**, 667-672.
- Hirose, T. & Sugiura, M. (1996).** Cis-acting elements and trans-acting factors for accurate translation of chloroplast *psbA* mRNAs: development of an *in vitro* translation system from tobacco chloroplasts. *EMBO J* **15**, 1687-1695.
- Hirose, T. & Sugiura, M. (1997).** Both RNA editing and RNA cleavage are required for translation of tobacco chloroplast *ndhD* mRNA: a possible regulatory mechanism for expression of a chloroplast operon consisting of functionally unrelated genes. *EMBO J* **16**, 6804-6811.
- Hirose, T., Kusumegi, T. & Sugiura, M. (1998).** Translation of tobacco chloroplast *rps14* mRNA depends on a Shine-Dalgarno-like sequence in the 5'-untranslated region but not on internal RNA editing in the coding region. *FEBS Letters* **430**, 257-260.
- Hirose, T., Kusumegi, T., Tsudzuki, T. & Sugiura, M. (1999).** RNA editing sites in tobacco chloroplast transcripts: editing as a possible regulator of chloroplast RNA polymerase activity. *MGG* **262**, 462-467.
- Hirose, T. & Sugiura, M. (2001).** Involvement of a site-specific *trans*-acting factor and a common RNA-binding protein in the editing of chloroplast mRNAs: development of a chloroplast *in vitro* RNA editing system. *EMBO J* **20**, 1144-1152.
- Hoch, B., Maier, R. M., Appel, K., Igloi, G. L. & Kössel, H. (1991).** Editing of a chloroplast mRNA by creation of an initiation codon. *Nature* **353**, 178-180.
- Hoffman, P. D., Batschauer, A. & Hays, J. B. (1996).** PHH1, a novel gene from *Arabidopsis thaliana* that encodes a protein similar to plant blue-light photoreceptors and microbial photolyases. *MGG* **253**, 259-265.
- Holton, T. A. & Graham, M. W. (1991).** A simple and efficient method for direct cloning of PCR products using ddT-tailed vectors. *NAR* **19**, 1154.
- Hsiao, K. (1991).** A fast and simple procedure for sequencing double stranded DNA with sequenase. *NAR* **19**, 2787.
- Hu, J. & Bogorad, L. (1990).** Maize chloroplast RNA polymerase: the 180-, 120-, and 38-kilodalton polypeptides are encoded in chloroplast genes. *PNAS* **87**, 1531-1535.
- Hu, J., Troxler, R. F. & Bogorad, L. (1991).** Maize chloroplast RNA polymerase: the 78-kilodalton polypeptide is encoded by the plastid *rpoC1* gene. *NAR* **19**, 3431-3434.
- Hu, J.-M., Lavin, M., Wojciechowski, M. F. & Sanderson, M. J. (2000).** Phylogenetic systematics of the tribe Millettieae (Leguminosae) based on chloroplast *trnK/matK* sequences and its implications for evolutionary patterns in Papilionoideae. *American Journal of Botany* **87**, 418-430.

- Hübschmann, T., Hess, W. R. & Börner, T. (1996).** Impaired splicing of *rps12* transcripts in ribosome-deficient plastids. *Plant Mol Biol* **30**, 109-123.
- Hupfer, H., Swiatek, M., Hornung, S., Herrmann, R. G., Maier, R. M., Chiu, W. L. & Sears, B. (2000).** Complete nucleotide sequence of the *Oenothera elata* plastid chromosome, representing plastome I of the five distinguishable euoenothera plastomes. *MGG* **263**, 581-585.
- Isono, K., Shimizu, M., Yoshimoto, K., Niwa, Y., Satoh, K., Yokota, A. & Kobayashi, H. (1997).** Leaf-specifically expressed genes for polypeptides destined for chloroplasts with domains of sigma70 factors of bacterial RNA polymerases in *Arabidopsis thaliana*. *PNAS* **94**, 14948-14953.
- Jenkins, B. D., Kulhanek, D. J. & Barkan, A. (1997).** Nuclear mutations that block group II RNA splicing in maize chloroplasts reveal several intron classes with distinct requirements for splicing factors. *Plant Cell* **9**, 283-296.
- Ju, J., Kheterpal, I., Scherer, J. R., Ruan, C., Fuller, C. W., Glazer, A. N. & Mathies R. A. (1995).** Design and synthesis of fluorescence energy transfer dye-labeled primers and their application for DNA sequencing and analysis. *Anal Biochem* **231**, 131-140.
- Kanamaru, K., Fujiwara, M., Seki, M., Katagiri, T., Nakamura, M., Mochizuki, N., Nagatani, A., Shinozaki, K., Tanaka, K. & Takahashi, H. (1999).** Plastidic RNA polymerase sigma factors in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology* **40**, 832-842.
- Kaneko, T., Sato, S., Kotani, H., Tanaka, A., Asamizu, E., Nakamura, Y., Miyajima, N., Hirosawa, M., Sugiura, M., Sasamoto, S., Kimura, T., Hosouchi, T., Matsuno, A., Muraki, A., Nakazaki, N., Naruo, K., Okumura, S., Shimpo, S., Takeuchi, C., Wada, T., Watanabe, A., Yamada, M., Yasuda, M. & Tabata, S. (1996).** Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis sp.* strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *DNA Research* **3**, 109-136.
- Kapoor, S., Suzuki, J. Y. & Sugiura, M. (1997).** Identification and functional significance of a new class of non-consensus-type plastid promoters. *Plant J* **11**, 327-337.
- Karcher, D. & Bock, R. (1998).** Site-selective inhibition of plastid RNA editing by heat shock and antibiotics: a role for plastid translation in RNA editing. *NAR* **26**, 1185-1190.
- Karcher, D. & Bock, R. (2002-a).** The amino acid sequence of a plastid protein is developmentally regulated by RNA editing. *Journal of Biochemistry* **277**, 5570-5574.
- Karcher, D. & Bock, R. (2002-b).** Temperature sensitivity of RNA editing and intron splicing in the plastid *ndhB* transcript. *Curr Genet* **41**, 48-52.
- Kato, T., Kaneko, T., Sato, S., Nakamura, Y. & Tabata, S. (2000).** Complete structure of the chloroplast genome of a legume, *Lotus japonicus*. *DNA Research* **7**, 323-330.

- Kaufman, D. L. & Evans, G. A. (1990).** Restriction endonuclease cleavage at the termini of PCR products. *BioTechniques* **9**, 304-306.
- Kestermann, M., Neukirchen, S., Kloppstech, K. & Link, G. (1998).** Sequence and expression characteristics of a nuclear-encoded chloroplast sigma factor from mustard (*Sinapis alba*). *NAR* **26**, 2747-2753.
- Kim, M., Thum, K. E., Morishige, D. T. & Mullet, J. E. (1999).** Detailed architecture of the barley chloroplast *psbD-psbC* blue light-responsive promoter. *JBC* **274**, 4684-4692.
- Klein, T. M., Wolf, E. D., Wu, R. & Sanford, J. C. (1987).** High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature* **327**, 70-73.
- Klein, T. M., Harper, E. C., Svab, Z., Sanford, J. C., Fromm, M. E. & Maliga, P. (1988-a).** Stable genetic transformation of intact *Nicotiana* cells by the particle bombardment process. *PNAS* **85**, 8502-8505.
- Klein, T. M., Fromm, M. E., Weissinger, A., Tomes, D., Schaaf, S., Sletten, M. & Sanford, J. C. (1988-b).** Transfer of foreign genes into intact maize cells using high-velocity microprojectiles. *PNAS* **85**, 4305-4309.
- Klein, T. M., Gradziel, T., Fromm, E. M. & Sanford, J. C. (1988-c).** Factors influencing gene delivery into *Zea mays* cells by high-velocity microprojectiles. *Bio/Technology* **6**, 559-563.
- Koch, W., Edwards, K. & Kössel, H. (1981).** Sequencing of the 16S-23S spacer in a ribosomal RNA operon of *Zea mays* chloroplast DNA reveals two split tRNA genes. *Cell* **25**, 203-13.
- Kohchi, T., Umesono, K., Ogura, Y., Komine, Y., Nakahigashi, K., Komano, T., Yamada, Y., Ozeki, H. & Ohymama, K. (1988).** A nicked group II intron and *trans*-splicing in liverwort, *Marchantia polymorpha*, chloroplasts. *NAR* **16**, 10025-10036.
- Kolodner, R. & Tewari, K. K. (1975-a).** The molecular size and conformation of the chloroplast DNA from higher plants. *Biochimica et Biophysica Acta* **402**, 372-390.
- Kolodner, R. & Tewari, K. K. (1975-b).** Chloroplast DNA from higher plants replicates by both the Cairns and rolling circle mechanism. *Nature* **256**, 707-711.
- Koop, H.-U., Steinmüller, K., Wagner, H., Rossler, C., Eibl, C. & Sacher, L. (1996).** Integration of foreign sequences into the tobacco plastome via polyethylene glycol-mediated protoplast transformation. *Planta* **199**, 193-201.
- Kosasi, S., Van der Sluis, W. G., Boelens, R. T., Hart, L. A. & Labadie, R. P. (1989).** Labaditin, a novel cyclic decapeptide from the latex of *Jatropha multifida* L. (*Euphorbiaceae*). Isolation and sequence determination by means of two-dimensional NMR. *FEBS Letters* **256**, 91-96.

- Kowallik, K. V., Stoebe, B., Schaffran, I., Kroth-Pancic, P. & Freier, U. (1995).** The chloroplast genome of the chlorophyll a+b containing alga, *Odontella sinensis*. *Plant Mol Biol Rep* **13**, 336-342.
- Krause, K., Maier, R. M., Kofer, W., Krupinska, K. & Herrmann, R. G. (2000).** Disruption of plastid-encoded RNA polymerase genes in tobacco: expression of only a distinct set of genes is not based on selective transcription of the plastid chromosome. *MGG* **263**, 1022-1030.
- Kudla, J., Igloi, G. L., Metzlauff, M., Hagemann, R. & Kössel, H. (1992).** RNA editing in tobacco chloroplasts leads to the formation of a translatable *psbL* mRNA by C to U substitution within the initiation codon. *EMBO J* **11**, 1099-1103.
- Kudla, J. & Bock, R. (1999).** RNA editing in an untranslational region of the *Ginkgo* chloroplast genome. *Gene* **234**, 81-86.
- Kunnimalaiyaan, M., Shi, F. & Nielsen, B. L. (1997).** Analysis of the tobacco chloroplast DNA replication origin (*oriB*) downstream of the 23S rRNA gene. *J Mol Biol* **268**, 273-283.
- Kunnimalaiyaan, M., & Nielson, B. L. (1997).** Fine mapping of replication origins (*oriA* and *oriB*) in *Nicotiana tabacum* chloroplast DNA. *NAR* **25**, 3681-3686.
- Kuroda, H. & Maliga, P. (2002).** Overexpression of the *clpP* 5'-untranslated region in a chimeric context causes a mutant phenotype, suggesting competition for a *clpP*-specific RNA maturation factor in tobacco chloroplasts. *Plant Physiol* **129**, 1600-1606.
- Kyte, J. & Doolittle, R. F. (1982).** A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* **157**, 105-132.
- Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* **227**, 680-685.
- Lahiri, S. D., Yao, J., McCumbers, C. & Allison, L. A. (1999).** Tissue-specific and light-dependent expression within a family of nuclear-encoded sigma-like factors from *Zea mays*. *Mol Cell Biol Res Commun* **1**, 14-20.
- Lahiri, S. D. & Allison, L. A. (2000).** Complementary expression of two plastid-localized sigma-like factors in maize. *Plant Physiol* **123**, 883-894.
- Lake, J. A. & Rivera, M. C. (1994).** Was the nucleus the first endosymbiont? *PNAS* **91**, 2880-2881.
- Lambowitz, A. M. & Belfort, M. (1993).** Introns as mobile genetic elements. *Annual Review of Biochemistry* **62**, 587-622.
- Legen, J., Schmitz-Linneweber, C., Drescher, A., Hupfer, H., Tillich, M., Herrmann, R. G. & Maier, R. M. (2001).** Decoding of the *ndhH* operon from spinach: an example for the complexity of plastid gene expression in higher plants. *Endocytobiosis & Cell Research* **14**, 11-20.

- Legen, J., Kemp, S., Krause, K., Profanter, B., Herrmann, R. G. & Maier, R. M. (2002).** Comparative analysis of plastid transcription profiles of entire plastid chromosomes from tobacco attributed to wild-type and PEP-deficient transcription machineries. *Plant J* **31**, 171-188.
- Lehrach, H., Diamond, D., Wozney, J. M. & Boedtker, H. (1977).** RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions: A critical reexamination. *Biochemistry* **16**, 4743-4751.
- Liere, K. & Link, G. (1995).** RNA-binding activity of the *matK* protein encoded by the chloroplast *trnK* intron from mustard (*Sinapis alba* L.). *NAR* **23**, 917-921.
- Liu, B. & Troxler, R. F. (1996).** Molecular characterization of a positively photoregulated nuclear gene for a chloroplast RNA polymerase sigma factor in *Cyanidium caldarium*. *PNAS* **93**, 3313-3318.
- Lu, Z., Kunnimalaiyaan, M. & Nielsen, B. L. (1996).** Characterization of replication origins flanking the 23S rRNA gene in tobacco chloroplast DNA. *Plant Mol Biol* **32**, 693-706.
- Lübberstedt, T., Bolle, C. E., Sopory, S., Flieger, K., Herrmann, R. G. & Oelmüller, R. (1994).** Promoters from genes for plastid proteins possess regions with different sensitivities toward red and blue light. *Plant Physiol* **104**, 997-1006.
- Maier, R. M., Hoch, B., Zeltz, P. & Kössel, H. (1992).** Internal Editing of the Maize Chloroplast *ndhA* Transcript Restores Codons for Conserved Amino Acids. *Plant Cell* **4**, 609-616.
- Maier, R. M., Neckermann, K., Igloi, G. L. & Kössel, H. (1995).** Complete sequence of the maize chloroplast genome: gene content, hotspots of divergence and fine tuning of genetic information by transcript editing. *J Mol Biol* **251**, 614-628.
- Maier, R. M., Zeltz, P., Kössel, H., Bonnard, G., Gualberto, J. M. & Grienenberger, J. M. (1996).** RNA editing in plant mitochondria and chloroplasts. *Plant Mol Biol* **32**, 343-365.
- Malek, O., Lattig, K., Hiesel, R., Brennicke, A. & Knoop, V. (1996).** RNA editing in bryophytes and a molecular phylogeny of land plants. *EMBO J* **15**, 1403-1411.
- Maliga, P. (1993).** Towards plastid transformation in flowering plants. *Trends in Biotechnology* **11**, 101-107.
- Maliga, P., Carrer, H., Kanevski, I., Staub, J. & Svab, Z. (1993).** Plastid engineering in land plants: a conservative genome is open to change. *Philosophical Transactions, The Royal Society London: Biological Sciences* **342**, 203-208.
- Maliga, P., Staub, J., Carrer, H., Kanevski, I. & Svab, Z. (1994).** Homologous recombination and integration of foreign DNA in plastids of higher plants. In: *Homologous recombination in plants*. Paszkowski, J. (ed.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Niederlande, 83-93.

- Manning, J. E., Wolstenholme, D. R., Ryan, R. S., Hunter, J. A. & Richards, O. C. (1971).** Circular chloroplast DNA from *Euglena gracilis*. PNAS **68**, 1169-1173.
- Marchuk, D., Drumm, M., Saulino, A. & Collins, F. S. (1991).** Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products. NAR **19**, 1156.
- Marechal-Drouard, L., Weil, J. H. & Guillemaut, P. (1988).** Import of several tRNAs from the cytoplasm into the mitochondria in bean *Phaseolus vulgaris*. NAR **16**, 4777-4788.
- Marston, F. A., Lowe, P. A., Doel, M. T., Schoemaker, J. M., White, S. & Angal, S. (1984).** Purification of calf prochymosin (prorennin) synthesized in *Escherichia coli*. Bio/Technology **2**, 800-804.
- Marston, F. A. (1986).** The purification of eukaryotic polypeptides synthesized in *Escherichia coli*. Biochemical Journal **240**, 1-12.
- Marston, F. A. & Hartley, D. L. (1990).** Solubilization of protein aggregates. Methods Enzymol **182**, 264-276.
- Martin, W. & Schnarrenberger, C. (1997).** The evolution of the Calvin cycle from prokaryotic to eukaryotic chromosomes: a case study of functional redundancy in ancient pathways through endosymbiosis. Curr Genet **32**, 1-18.
- Martin, W. & Herrmann, R. G. (1998).** Gene transfer from organelles to the nucleus: how much, what happens and why? Plant Physiol **118**, 9-17.
- Martin, W. & Müller, M. (1998).** The hydrogen hypothesis for the first eukaryote. Nature **392**, 37-41.
- Martin, W., Stoebe, B., Gremykin, V., Hansmann, S., Hasegawa, M. & Kowallik, K. (1998).** Gene transfer to the nucleus and the evolution of chloroplasts. Nature **393**, 162-165.
- Marx, J. (1996).** Plants, like animals, may make use of peptide signals. Science **273**, 1338-1339.
- Matsubayashi, T., Wakasugi, T., Shinozaki, K., Yamagushi-Shinozaki, K., Zaita, N., Hidaka, T., Meng, B. Y., Ohto, C., Tanaka, M., Kato, A., Maruyama, T. & Sugiura, M. (1987).** Six chloroplast genes (*ndhA-F*) homologous to human mitochondrial genes encoding components of the respiratory chain NADH dehydrogenase are actively expressed: Determination of splice sites in *ndhA* and *ndhB* pre-mRNAs. MGG **210**, 385-393.
- Mayfield, S. P., Cohen, A., Danon, A. & Yohn, C. B. (1994).** Translation of the *psbA* mRNA of *Chlamydomonas reinhardtii* requires a structured RNA element contained within the 5' untranslated region. J Cell Biol **127**, 1537-1545.

- McMaster, G. & Carmichael, G. G. (1977).** Analysis of single- and double-stranded nucleic acids on polyacrylamide and agarose gels by using glyoxal and acridine orange. PNAS **74**, 4835-4838.
- Meinkoth, J. & Wahl, G. (1984).** Hybridization of nucleic acids immobilized on solid supports. Anal Biochem **138**, 267-284.
- Melton, D. A., Krieg, P. A., Rebagliati, M. R., Maniatis, T., Zinn, K. & Green, M. R. (1984).** Efficient *in vitro* synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter. NAR **12**, 7035-7056.
- Mereschowsky, C. (1905).** Über die Natur und den Ursprung der Chromatophoren im Pflanzenreiche. Biologisches Zentralblatt **25**, 593-604.
- Meurer, J., Meierhoff, K. & Westhoff, P. (1996).** Isolation of high-chlorophyll-fluorescence mutants of *Arabidopsis thaliana* and their characterisation by spectroscopy, immunoblotting and northern hybridisation. Planta **198**, 385-396.
- Michaelis, P. (1966).** Plasmatische Vererbung beim Weidenröschen (*Epilobium*). Umschau **19**, 629-635. In: von Sengbusch, P. (1979). Molekular- und Zellbiologie. Springer Verlag, Berlin - Heidelberg - New York.
- Miller, H. (1987).** Practical aspects of preparing phage and plasmid DNA: growth, maintenance, and storage of bacteria and bacteriophage. Methods Enzymol **152**, 145-170.
- Miyamoto, T., Obokata, J. & Sugiura, M. (2002).** Recognition of RNA editing sites is directed by unique proteins in chloroplasts: biochemical identification of *cis*-acting elements and *trans*-acting factors involved in RNA editing in tobacco and pea chloroplasts. Molecular and Cellular Biology **22**, 6726-6734.
- Mohr, G., Perlman, P. S. & Lambowitz, A. M. (1993).** Evolutionary relationships among group II intron-encoded proteins and identification of a conserved domain that may be related to maturase function. NAR **21**, 4991-4997.
- Moran, J. V., Mecklenburg, K. L., Sass, P., Belcher, S. M., Mahnke, D., Lewin, A. & Perlman, P. (1994).** Splicing defective mutants of the *COXI* gene of yeast mitochondrial DNA: initial definition of the maturase domain of the group II intron AI2. NAR **22**, 2057-2064.
- Morden, C. W., Wolfe, K. H., dePamphilis, C. W. & Palmer, J. D. (1991).** Plastid translation and transcription genes in a non-photosynthetic plant: intact, missing and pseudo genes. EMBO J **10**, 3281-3288.
- Morikawa, K., Shiina, T., Murakami, S. & Toyoshima, Y. (2002).** Novel nuclear-encoded proteins interacting with a plastid sigma factor, Sig1, in *Arabidopsis thaliana*. FEBS Letters **514**, 300-304.
- Mörl, M. & Marchfelder, A. (2001).** The final cut. The importance of tRNA 3' processing. EMBO Reports **2**, 17-20.

- Mourad, G., Polacco, M., Skögen-Hagenson, M. J., Morris, D. & Robertson, D. (1989).** A maternally inherited mutant of *Zea mays* L. lacks the cytochrome b/f complex. *Curr Genet* **16**, 109-116.
- Mühlbauer, S. K., Lössl, A., Tsekova, L., Zou, Z. & Koop, H.-U. (2002).** Functional analysis of plastid DNA replication origins in tobacco by targeted inactivation. *Plant J* **32**, 175-184.
- Mullis, K. & Faloona, F. (1987).** Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalysed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**, 335-350.
- Murashige, T. & Skoog, F. (1962).** A revised medium for growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* **15**, 473-497.
- Nemoto, Y., Kawano, S., Kondoh, K., Nagata, T. & Kuroiwa, T. (1990).** Studies on plastid-nuclei (nucleoids) in *Nicotiana tabacum* L. III. Isolation of chloroplast-nuclei from mesophyll protoplasts and identification of chloroplast DNA-binding proteins. *Plant and Cell Physiology* **31**, 767-776.
- Nickelsen, J., van Dellewijn, J., Rahire, M. & Rochaix, J.-D. (1994).** Determinants for stability of the chloroplast *psbD* RNA are located within its short leader region in *Chlamydomonas reinhardtii*. *EMBO J* **13**, 3182-3191.
- Nimzyk, R., Schondorf, T. & Hachtel, W. (1993).** In-frame length mutations associated with short tandem repeats are located in unassigned open reading frames of *Oenothera* chloroplast DNA. *Curr Genet* **23**, 265-270.
- Ogata, K., Arakawa, M., Kasahara, T., Shioiri-Nakano, K. & Hiraoka, K. (1983).** Detection of toxoplasma membrane antigens transferred from SDS-polyacrylamide gel to nitrocellulose with monoclonal antibody and avidin-biotin, peroxidase anti-peroxidase and immunoperoxidase methods. *Journal of Immunological Methods* **65**, 75-82.
- Ohyama, K., Fukuzawa, H., Kohchi, T., Shirai, H., Sano, T., Sano, S., Umesono, K., Shiki, Y., Takeuchi, M., Chang, Z., Aota, S., Inokuchi, H. & Ozeki, H. (1986).** Chloroplast gene organization deduced from complete sequence of liverwort *Marchantia polymorpha* chloroplast DNA. *Nature* **322**, 572-574.
- Oommen, A., Li, X. Q. & Gegenheimer, P. (1992).** Cleavage specificity of chloroplast and nuclear tRNA 3'-processing nucleases. *Mol Cell Biol* **12**, 865-875.
- Ornstein, L. (1964).** Disc electrophoresis I: Background and theory. *Annals of the New York Academy of Sciences* **121**, 321-349.
- Palmer, J. D. & Thompson, W. F. (1982).** Chloroplast DNA rearrangements are more frequent when a large repeat sequence is lost. *Cell* **29**, 537-550.
- Palmer, J. D. (1990).** Contrasting modes and tempos of genome evolution in land plant organelles. *Trends Genet* **6**, 115-120.

- Piccioni, R., Bellemare, G. & Chua, N.-H. (1982).** In: Methods in chloroplast molecular biology. Edelman, M., Hallick, R. B. & Chua, N.-H. (eds.), Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, 1081-1092.
- The Recombinant Protein Handbook (2000).** Protein Amplification and Simple Purification. Amersham Pharmacia Biotech.
- Reed, K. C. & Mann, D. A. (1985).** Rapid transfer of DNA from agarose gels to nylon membranes. *NAR* **13**, 7207-7221.
- Reed, M. L. & Hanson, M. R. (1997).** A heterologous maize *rpoB* site is recognized by transgenic tobacco chloroplasts. *Mol Cell Biol* **17**, 6948-6952.
- Reed, M. L., Peeters, N. M. & Hanson, M. R. (2001).** A single alteration 20 nt 5' to an editing target inhibits chloroplast RNA editing *in vivo*. *NAR* **29**, 1507-1513.
- Rehm, H. (2000).** Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg – Berlin.
- Reinbothe, S., Reinbothe, C., Heintzen, C., Seidenbacher, C. & Parthier, B. (1993).** A methyl jasmonate-induced shift in the length of the 5' untranslated region impairs translation of the plastid *rbcL* transcript in barley. *EMBO J* **12**, 1505-1512.
- Reith, M. & Munholland, J. (1995).** Complete nucleotide sequence of the *Porphyra purpurea* chloroplast genome. *Plant Mol Biol Rep* **13**, 333-335.
- Rivier, C., Goldschmidt-Clermont, M. & Rochaix, J. D. (2001).** Identification of an RNA-protein complex involved in chloroplast group II intron trans-splicing in *Chlamydomonas reinhardtii*. *EMBO J* **20**, 1765-1773.
- Robinson, C. & Barnett, L. K. (1988).** Isolation and analysis of chloroplasts. In: Plant Molecular Biology, A Practical Approach. Shaw, C. H. (ed.), IRL Press Oxford, 67-78.
- Rochaix, J.-D. (1995).** *Chlamydomonas reinhardtii* as the photosynthetic yeast. *Annual Review of Genetics* **29**, 209-230.
- Rosenblum, B. B., Lee, L. G., Spurgeon, S. L., Khan, S. H., Menchen, S. M., Heiner, C. R., Chen, S. M. (1997).** New dye-labeled terminators for improved DNA sequencing patterns. *NAR* **25**, 4500-4504.
- Ruf, M. & Kössel, H. (1988).** Occurrence and spacing of ribosome recognition sites in mRNAs of chloroplasts from higher plants. *FEBS Letters* **240**, 41-44.
- Ruf, S., Zeltz, P. & Kössel, H. (1994).** Complete RNA editing of unspliced and dicistronic transcripts of the intron-containing reading frame IRF170 from maize chloroplasts. *PNAS* **91**, 2295-2299.

- Ruf, S., Kössel, H. & Bock, R. (1997).** Targeted inactivation of a tobacco intron-containing open reading frame reveals a novel chloroplast-encoded photosystem I-related gene. *J Cell Biol* **139**, 95-102.
- Ruf, S. & Kössel, H. (1997).** Tissue-specific and differential editing of two *ycf3* editing sites in maize plastids. *Curr Genet* **32**, 19-23.
- Ruf, S., Biehler, K. & Bock, R. (2000).** A Small Chloroplast-encoded Protein as a Novel Architectural Component of the Light-harvesting Antenna. *J Cell Biol* **149**, 369-377.
- Ruf, S., Hermann, M., Berger, I. J., Carrer, H. & Bock, R. (2001).** Stable genetic transformation of tomato plastids and expression of a foreign protein in fruit. *Nature Biotechnology* **19**, 870-875.
- Saiki, R. K., Scharf, S. J., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. & Arnheimer, N. (1985).** Enzymatic Amplification of β -Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia. *Science* **230**, 1350-1354.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. & Erlich, H. A. (1988).** Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.
- Sakamoto, W., Chen, X., Kindle, K. L. & Stern, D. B. (1994).** Function of the *Chlamydomonas reinhardtii* *petD* 5' untranslated region in regulating the accumulation of subunit IV of the cytochrome b_6/f complex. *Plant J* **6**, 503-512.
- Salvador, M. L., Klein, U. & Bogorad, L. (1993).** 5' sequences are important positive and negative determinants of the longevity of *Chlamydomonas* chloroplast gene transcripts. *PNAS* **90**, 1556-1560.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989).** *Molecular Cloning. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.
- Sambrook, J. & Russell, D. (2001).** *Molecular Cloning. A laboratory manual on the web.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.
- Sanford, J. C., DeVit, M. J., Russell, J. A., Smith, F. D., Harpending, P. R., Roy, M. K. & Johnston, S. A. (1991).** An improved helium-driven biolistic device. *Technique* **3**, 3-16.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977).** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *PNAS* **74**, 5463-5467.
- Sanger, F. & Coulson, A. R. (1978).** The use of thin acrylamide gels for DNA sequencing. *FEBS Letters* **87**, 107-110.
- Sato, S., Nakamura, Y., Kaneko, T., Asamizu, E. & Tabata, S. (1999).** Complete structure of the chloroplast genome of *Arabidopsis thaliana*. *DNA Research* **6**, 283-290.

- Sato, N. (2001).** Was the evolution of plastid genetic machinery discontinuous? *Trends in Plant Science* **6**, 151-155.
- Schägger, H., von Jagow, G. (1987).** Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* **166**, 368-379.
- Schaller, A. (1999).** Oligopeptide signalling and the action of systemin. *Plant Mol Biol* **40**, 763-769.
- Scharf, S. J., Horn, G. T. & Erlich, H. A. (1986).** Direct cloning and sequence analysis of enzymatically amplified genomic sequences. *Science* **233**, 1076-1078.
- Schimper, A. F. W. (1883).** Über die Entwicklung der Chlorophyll-Körner und Farb-Körner. *Botanische Zeitschrift* **41**, 105-114.
- Schmitz-Linneweber, C., Maier, R. M., Alcaraz, J. P., Cottet, A., Herrmann, R. G. & Mache, R. (2001-a).** The plastid chromosome of spinach (*Spinacia oleracea*): complete nucleotide sequence and gene organization. *Plant Mol Biol* **45**, 307-315.
- Schmitz-Linneweber, C., Tillich, M., Herrmann, R. G. & Maier, R. M. (2001-b).** Heterologous, splicing-dependent RNA editing in chloroplasts: allotetraploidy provides *trans*-factors. *EMBO J* **20**, 4874-4883.
- Schmitz-Linneweber, C., Regel, R., Du, T.-G., Hupfer, H., Herrmann, R. G. & Maier, R. M. (2002).** The plastid chromosome of *Atropa belladonna* and its comparison with that of *Nicotiana tabacum*: the role of RNA editing in generating divergence in the process of plant speciation. *Mol Biol Evol* **19**, 1602-1612.
- Schoepfer, R. (1993).** The pRSET family of T7 promoter expression vectors for *Escherichia coli*. *Gene* **124**, 83-85.
- Schwartz, R. M. & Dayhoff, M. O. (1978).** Origins of prokaryotes, eukaryotes, mitochondria and chloroplasts. *Science* **199**, 395-403.
- Schwartz, D. C. & Cantor, C. R. (1984).** Separation of Yeast Chromosome-sized DNAs by Pulsed Field Gradient Gel Electrophoresis. *Cell* **37**, 67-75.
- Seeburg, P., Shine, J., Martial, J. A., Baxter, J. D. & Goodman, H. M. (1977).** Nucleotide sequence and amplification in bacteria of structural gene for rat growth hormone. *Nature* **270**, 486-494.
- Sexton, T. B., Christopher, D. A. & Mullet, J. E. (1990).** Light-induced switch in barley *psbD-psbC* promoter utilization: a novel mechanism regulating chloroplast gene expression. *EMBO J* **9**, 4485-4494.
- Shapiro, A. L., Vinuela, E. & Maizel, J. V. Jr. (1967).** Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **28**, 815-820.

- Sharp, P. A., Sugden, B. & Sambrook, J. (1973).** Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis. *Biochemistry* **12**, 3055-3063.
- Shinozaki, K., Ohme, M., Tanaka, M., Wakasugi, T., Hayashida, N., Matsubayashi, T., Zaita, N., Chunwongse, J., Obokata, J., Yamguchi-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., Shimida, H. & Sugiura, M. (1986).** The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome: its gene organization and expression. *EMBO J* **5**, 2043-2049.
- Sidorov, V. A., Kasten, D., Pang, S.-Z., Hajdukiewicz, P. T. J., Staub, J. M. & Nehra, N. (1999).** Stable chloroplast transformation in potato: use of green fluorescent protein as a plastid marker. *Plant J* **19**, 209-216.
- Silhavy, D. & Maliga, P. (1998).** Mapping of promoters for the nucleus-encoded plastid RNA polymerase (NEP) in the *iojap* maize mutant. *Curr Genet* **33**, 340-344.
- Simpson, C. L. & Stern, D. B. (2002).** The treasure trove of algal chloroplast genomes. Surprises in architecture and gene content, and their functional implications. *Plant Physiol* **129**, 957-966.
- Sitte, P. & Eschbach, S. (1992).** Cytobiosis and Its Significance in Cell Evolution. *Progress in Botany* **53**, 29-43.
- Soltis, D. E. & Soltis, P. S. (1995).** The dynamic nature of polyploid genomes. *PNAS* **92**, 8089-8091.
- Southern, E. M. (1975).** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**, 503-517.
- Sowden, M. P., Ballatori, N., Jensen, K. L., Reed, L. H. & Smith, H. C. (2002).** The editosome for cytidine to uridine mRNA editing has a native complexity of 27S: identification of intracellular domains containing active and inactive editing factors. *Journal of Cell Science* **115**, 1027-1039.
- Staub, J. M. & Maliga, P. (1992).** Long regions of homologous DNA are incorporated into the tobacco plastid genome by transformation. *Plant Cell* **4**, 39-45.
- Staub, J. M. & Maliga, P. (1994).** Translation of *psbA* mRNA is regulated by light via the 5'-untranslated region in tobacco plastids. *Plant J* **6**, 547-553.
- Stein, D. B., Palmer, J. D. & Thompson, W. F. (1986).** Structural evolution and flip-flop recombination of chloroplast DNA in the fern genus *Osmunda*. *Curr Genet* **10**, 835-841.
- Stirewalt, V. L., Michalowski, C. B., Löffelhardt, W., Bohnert, H. J. & Bryant, D. A. (1995).** Nucleotide sequence of the cyanelle genome from *Cyanophora paradoxa*. *Plant Mol Biol Rep* **13**, 327-332.

- Studier, F. W. (1973).** Analysis of bacteriophage T₇ early RNAs and proteins on slab gel electrophoresis. *J Mol Biol* **79**, 237-248.
- Studier, F. W. & Moffat, B. A. (1986).** Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* **189**, 113-130.
- Sugiura, M., Shinozaki, K., Zaito, N., Kusuda, M. & Kumano, M. (1986).** Clone bank of tobacco (*Nicotiana tabacum*) chloroplast genome as a set of overlapping restriction endonuclease fragments: mapping of eleven ribosomal protein genes. *Plant Science* **44**, 211-216.
- Sugiura, M., Hirose, T. & Sugita, M. (1998).** Evolution and mechanism of translation in chloroplasts. *Annual Review of Genetics* **32**, 437-459.
- Suzuki, H., Ingersoll, J., Stern, D. B. & Kindle, K. L. (1997).** Generation and maintenance of tandemly repeated extrachromosomal plasmid DNA in *Chlamydomonas* chloroplasts. *Plant J* **11**, 635-648.
- Svab, Z., Hajdukiewicz, P. T. J. & Maliga, P. (1990).** Stable transformation of plastids in higher plants. *PNAS* **87**, 8526-8530.
- Svab, Z. & Maliga, P. (1991).** Mutation proximal to the tRNA binding region of the *Nicotiana* plastid 16S rRNA confers resistance to spectinomycin. *MGG* **228**, 316-319.
- Swiatek, M., Kuras, R., Sokolenko, A., Higgs, D., Olive, J., Cinque, G., Müller, B., Eichacker, L. A., Stern, D. B., Bassi, R., Herrmann, R. G. & Wollman, F.-A. (2001).** The Chloroplast Gene *ycf9* Encodes a Photosystem II (PSII) Core Subunit, PsbZ, That Participates in PSII Supramolecular Architecture. *Plant Cell* **13**, 1347-1367.
- Swiatek, M., Greiner, S., Kemp, S., Drescher, A., Koop, H.-U., Herrmann R. G. & 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. *MGG* **232**, 191-198.
- Tan, S. & Troxler, R. F. (1999).** Characterization of two chloroplast RNA polymerase sigma factors from *Zea mays*: photoregulation and differential expression. *PNAS* **96**, 5316-5321.
- Thompson, M. D., Copertino, D. W., Thompson, E., Favreau, M. R. & Hallick, R. B. (1995).** Evidence for a late origin of introns in chloroplast genes from an evolutionary analysis of the genus *Euglena*. *NAR* **23**, 4745-4752.
- Thomson, W. W. & Whatley, J. M. (1980).** Development of nongreen plastids. *Annual Review of Plant Physiology* **31**, 375-394.

- Thum, K. E., Kim, M., Morishige, D. T., Eibl, C., Koop, H.-U. & Mullet, J. E. (2001).** Analysis of barley chloroplast *psbD* light-responsive promoter elements in transplastomic tobacco. *Plant Mol Biol* **47**, 353-366.
- Tiller, K., Eisermann, A. & Link, G. (1991).** The chloroplast transcription apparatus from mustard (*Sinapis alba* L.). Evidence for three different transcription factors which resemble bacterial sigma factors. *European Journal of Biochemistry* **198**, 93-99.
- Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979).** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *PNAS* **76**, 4350-4354.
- Tsudzuki, J., Ito, S., Wakasugi, T. & Sugiura, M. (1994).** A new encoding tRNA^{Pro} (GGG) is present in the chloroplast genome of black pine: a compilation of 32 tRNA genes from black pine chloroplasts. *Curr Genet* **12**, 153-158.
- Tsunoyama, Y., Morikawa, K., Shiina, T. & Toyoshima, Y. (2002).** Blue light specific and differential expression of a plastid σ factor, Sig5 in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters* **516**, 225-228.
- Ullmann, A., Jacob, F. & Monod, J. (1967).** Characterization by in vitro complementation of a peptide corresponding to an operator-proximal segment of the beta-galactosidase structural gene of *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **24**, 339-343.
- van de Sande, K., Pawlowski, K., Czaja, I., Wieneke, U., Schell, J., Schmidt, J., Walden, R., Matvienko, M., Wellink, J., van Kammen, A., Franssen, H. & Bisseling, T. (1996).** Modification of phytohormone response by a peptide encoded by ENOD40 of legumes and a nonlegume. *Science* **273**, 370-373.
- Voelker, R. & Barkan, A. (1995).** Nuclear genes required for post-translational steps in the biogenesis of chloroplast cytochrome *b₆f* complex in maize. *MGG* **249**, 507-514.
- Vogel, J., Hübschmann, T., Börner, T. & Hess, W. R. (1997).** Splicing and Intron-internal RNA Editing of *trnK-matK* Transcripts in Barley Plastids: Support for MatK as an Essential Splice Factor. *J Mol Biol* **270**, 179-187.
- Vogel, J., Börner, T. & Hess, W. R. (1999).** Comparative analysis of splicing of the complete set of chloroplast group II introns in three higher plant mutants. *NAR* **27**, 3866-3874.
- Vollrath, D. & Davis, R. W. (1987).** Resolution of DNA molecules greater than 5 megabases by contour-clamped homogeneous electric fields. *NAR* **15**, 7865-7876.
- Wakasugi, T., Hirose, T., Horihata, M., Tsudzuki, T., Kössel, H. & Sugiura, M. (1996).** Creation of a novel protein-coding region at the RNA level in black pine chloroplasts: The pattern of RNA editing in the gymnosperm chloroplast is different from that in angiosperms. *PNAS* **93**, 8766-8770.

- Wakasugi, T., Nagai, T., Kapoor, M., Sugita, M., Ito, M., Ito, S., Tsudzuki, J., Nakashima, K., Tsudzuki, T., Suzuki, Y., Hamada, A., Ohta, T., Inamura, A., Yoshinaga, K. & Sugiura, M. (1997).** Complete nucleotide sequence of the chloroplast genome from the green alga *Chlorella vulgaris*: The existence of genes possibly involved in chloroplast division. *PNAS* **94**, 5967-5972.
- Walbot, V. & Coe, E. H. (1979).** Nuclear gene *iojap* conditions a programmed change to ribosome-less plastids in *Zea mays*. *PNAS* **76**, 2760-2764.
- Weihe, A., Hedtke, B. & Börner, T. (1997).** Cloning and characterization of cDNA encoding a bacteriophage-type RNA polymerase from the higher plant *Chenopodium album*. *NAR* **25**, 2319-2325.
- Weihe, A. & Börner, T. (1999).** Transcription and the architecture of promoters in chloroplasts. *Trends in Plant Science* **4**, 169-170.
- Wendel, J. F. (2000).** Genome evolution in polyploids. *Plant Mol Biol* **42**, 225-249.
- Westermeier, R., Schickle, H. P. & Gronau, S. (1989).** SDS Elektrophorese in Vertikalsystemen. Ein Kochbuch für die 2001 – und die Midget-Kammer. Pharmacia LKB Biotechnologie, Freiburg.
- Wolfe, K. H., Morden, C. W. & Palmer, J. D. (1992).** Function and evolution of a minimal plastid genome from a nonphotosynthetic parasitic plant. *PNAS* **89**, 10648-10652.
- Wolfe, K. H. (1994).** Similarity between putative ATP-binding sites in land plant plastid ORF2280 proteins and the FtsH/CDC48 family of ATPases. *Curr Genet* **25**, 379-383.
- Yang, D., Oyaizu, Y., Oyaizu, H., Olsen, G. J. & Woese, C. R. (1985).** Mitochondrial origins. *PNAS* **82**, 4443-4447.
- Yanofsky, C. (2000).** Transcript attenuation: once viewed as a novel regulatory strategy. *J Bacteriol* **182**, 1-8.
- Yao, W. B., Meng, B. Y., Tanaka, M., Sugiura, M. (1989).** An additional promoter within the protein-coding region of the *psbD-psbC* gene cluster in tobacco chloroplast DNA. *NAR* **17**, 9583-9591.
- Yoshinaga, K., Iinuma, H., Masuzawa, T. & Uedal, K. (1996).** Extensive RNA editing of U to C in addition to C to U substitution in the *rbcL* transcripts of hornwort chloroplasts and the origin of RNA editing in green plants. *NAR* **24**, 1008-1014.
- Young, N. D. & dePamphilis, C. W. (2000).** Purifying selection detected in the plastid gene *matK* and flanking ribozyme regions within a group II intron of nonphotosynthetic plants. *Mol Biol Evol* **17**, 1933-1941.
- Zeltz, P., Hess, W. R., Neckermann, K., Börner, T. & Kössel, H. (1993).** Editing of the chloroplast *rpoB* transcript is independent of chloroplast translation and shows different patterns in barley and maize. *EMBO J* **12**, 4291-4296.

- Zeltz, P., Kadowaki, K., Kubo, N., Maier, R. M., Hirai, A. & Kössel, H. (1996).** A promiscuous chloroplast DNA fragment is transcribed in plant mitochondria but the encoded RNA is not edited. *Plant Mol Biol* **31**, 647-656.
- Zito, F., Kuras, R., Choquet, Y., Kössel, H. & Wollman, F.-A. (1997).** Mutations of cytochrome b_6 in *Chlamydomonas reinhardtii* disclose the functional significance for a proline to leucine conversion by *petB* editing in maize and tobacco. *Plant Mol Biol* **33**, 79-86.
- Zubko, M. K. & Day, A. (1998).** Stable albinism induced without mutagenesis: a model for ribosome-free plastid inheritance. *Plant J* **15**, 265-271.
- Zubko, M. K. & Day, A. (2002).** Differential regulation of genes transcribed by nucleus-encoded plastid RNA polymerase, and DNA amplification, within ribosome-deficient plastids in stable phenocopies of cereal albino mutants. *MGG* **267**, 27-37.

6.2 Publikationsliste

- Bock, R., Drescher, A. & Ruf, S. (1999).** Reverse genetics in higher plants. In: Endocytobiology VII (From Symbiosis to Eukaryotism). Wagner, E. *et al.* (eds.), 427-437.
- Drescher, A., Ruf, S., Calsa, T., Carrer, H. & Bock, R. (2000).** The two largest chloroplast genome-encoded open reading frames of higher plants are essential genes. *Plant J* **22**, 97-104.
- Legen, J., Schmitz-Linneweber, C., Drescher, A., Hupfer, H., Tillich, M., Herrmann, R. G. & Maier, R. M. (2001).** Decoding of the *ndhH* operon from spinach: an example for the complexity of plastid gene expression in higher plants. *Endocytobiosis & Cell Research* **14**, 11-20.
- Drescher, A., Hupfer, H., Nickel, C., Albertazzi, F., Hohmann, U., Herrmann, R. G. & Maier, R. M. (2002).** C-to-U conversion in the intercistronic *ndhI/ndhG* RNA of plastids from monocot plants: conventional editing in an unconventional small reading frame? *MGG* **267**, 262-269.
- Swiatek, M., Greiner, S., Kemp, S., Drescher, A., Koop, H.-U., Herrmann R. G. & 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.
- Poltnigg, P., Tillich, M., Funk, H., Drescher, A., Du, T.-G., Legen, J., Schmitz-Linneweber, C. & Maier, R. M. (2003).** Structure and expression of plastid genomes. In Arbeit.

7 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Anja Drescher
geboren am	24.9.1968
in	Olsberg (NRW)
Familienstand	ledig, keine Kinder
Staatsangehörigkeit	deutsch
Adresse	Fürstenrieder Str. 82b, 80686 München
Sprachkenntnisse	Englisch fließend Grundkenntnisse in Französisch

Ausbildung

Schulbildung	1975-1979 1979-1981 1981-1989	Grundschule in Mönchweiler Zinzendorf-Realschule in Königsfeld Zinzendorf-Gymnasium in Königsfeld Abitur 1989 (Durchschnittsnote 1,6)
Studium	1989-1997	Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, Studiengang Biologie (Diplom) Hauptfach: Genetik Nebenfächer: Zellbiologie, Mikrobiologie, Englisch Vordiplom 1993 (Durchschnittsnote 2,6) Diplom Dezember 1997 (Durchschnittsnote 1,8)
Thema der Diplomarbeit		Inaktivierung eines offenen Leserasters im Plastidengenom von Tabak (<i>ycf1</i>) mittels biolistischer Transformation (Note 1,1)
Promotion	1998-2003	Botanisches Institut der Ludwigs- Maximilians-Universität München
Praxiskolleg BWL und Management	24. Februar bis 16. Mai 2003	ATV Ausbildung Training Vernetzung GmbH in Kooperation mit der FH München

8 Abkürzungen

α - ³² P	radioaktives Phosphorisotop
°C	Grad Celsius
A	Ampère (Einheit der Stromstärke)
<i>aad</i>	Adenosin
<i>Acc</i>	Aminoglycosidadenylyltransferase-Gen
AG	<i>Acinetobacter aceti</i>
Amp	Arbeitsgruppe
Anal Biochem	Ampicillin
APG	Analytical Biochemistry
APS	Angiosperm Phylogeny Group
<i>atp</i>	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	ATP-Synthase-Gen
<i>Bam</i>	Adenosin-5'-triphosphat
BAP	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
BCIP	6-Benzylaminopurin
biolistisch	Bromchlorindolylphosphat
Bp	biologisch + ballistisch
<i>Bpi</i>	Basenpaar/e
BSA	<i>Bacillus pumillus</i>
<i>Bsp</i>	Rinderserumalbumin (engl., bovine serum albumin)
bzw.	<i>Bacillus species</i>
c	beziehungsweise
C	Centi (10 ⁻²)
ca.	Cytidin
cDNA	zirca
Chl	copy oder complementary DNA
Ci	Chlorophyll
Co.	Curie
COX	Companie
cp	Cytochrom C Oxidase-Gen
CTAB	chloroplast
CTP	N-Cethyl-N,N,N-trimethylammoniumbromid
Curr Genet	Cytidin-5'-triphosphat
cv.	Current Genetics
Δ	cultivar (= Sorte)
d	Deletionsmutante
Da	desoxy
dd	Dalton (Proteinmasseneinheit)
d.h.	didesoxy
D-loop	das heißt
DMSO	displacement loop
DNA	Dimethylsulfoxid
DNase	Desoxyribonukleinsäure (engl., deoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxyribonuklease
<i>Dpn</i>	Desoxy-Ribonukleosid-5'-triphosphat
DTE	<i>Diplococcus pneumoniae</i>
	Dithioerythrol

DTT	Dithiothreitol
<i>Ecl</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>
ECL	Enhanced Chemoluminescence
<i>Eco</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ed/s.	Herausgeber (engl., editor/s)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Bisaminoethoxyethantetraacetat
EM	Elektronenmikroskopie
EMBO (J)	The European Molecular Biology Organization (Journal)
engl.	englisch
<i>et al.</i>	et alii (Latein, und andere; hier: Mitarbeiter/innen)
evtl.	eventuell
F1	1. Generation
FEBS	Federation of European Biochemical Societies
g	Gramm
×g	Erdbeschleunigung (1 Gravo = 9,81 msec ⁻²)
G	Guanosin
GFP	green fluorescence protein
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
GUS	β-Glucuronidase
h	Stunde (Latein, hora)
<i>hcf</i>	high chlorophyll fluorescent
HEPES	Hydroxyethylpiperazinethansulfonsäure
<i>Hinc</i>	<i>Haemophilus influenzae</i> Rc
<i>Hind</i>	<i>Haemophilus influenzae</i> Rd
His	Histidin
HIV	Human Immunodeficiency Virus
IB	“Inclusion Bodies”
Inc.	Incorporated
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
IR	“Inverted Repeats”-Region
IRD	infrared-Dye (IRDye™)
J	Joule
J Bacteriol	Journal of Bacteriology
JBC	Journal of Biological Chemistry
J Cell Biol	Journal of Cell Biology
J Mol Biol	Journal of Molecular Biology
kB	kilo (1.000) Basenpaare
λ	Wellenlänge
l	Liter
	lösliche Proteine
<i>lacZ</i>	β-Galaktosidase-Gen (Lactose- Stoffwechsel)
LB	Luria broth bzw. Luria-Bertani-Medium
LBG	Luria broth + Glucose
LDS	Lithiumdodecylsulfat
LMP	low melting point
LTR	„long-terminal repeats“-Element
Luminol	Aminophtalhydrazid (= 5-Amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione)

Lys	Lysin
μ	Mikro (10 ⁻⁶)
m	Milli (10 ⁻³)
	Meter
	Membranfraktion
M	Molar (mol/l)
	Marker
<i>mat</i>	Maturase-Gen
matKO	<i>matK</i> „knock-out“
matK _{Om}	<i>matK</i> „knock-out“, modifiziert
Methods Enzymol	Methods in Enzymology
MGG	Molecular Genetics and Genomics (vormals Molecular and General Genetics)
min	Minute/n
mol	molare Masse (6×10 ²³ Moleküle)
Mol Biol Evol	Molecular Biology and Evolution
Mol Cell Biol (Res Commun)	Molecular and Cellular Biology (Research Communications)
MOPS	4-Morpholinpropansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
Mu	Mutator (Transposon)
n	Nano (10 ⁻⁹)
N	Normal (1. Wertigkeit/M)
NAA	Naphtylacetat
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid + H⁺
NAR	Nucleic Acids Research
NBT	Nitroblautetrazolium
NC	non-consensus
NEB	New England Biolabs
<i>Nde</i>	<i>Neisseria denitrificans</i>
<i>ndh</i>	NADH-Dehydrogenasegen
NEP	kernkodierte RNA-Polymerase (engl. nuclear encoded polymerase)
NET	NaCl/EDTA/Tris (-haltiger Puffer)
NP40	Nonidet P-40
NTA	Nitrilotriacetic acid
OD	optische Dichte
ORF	offenes Leseraster (engl. open reading frame)
<i>ori</i>	origin of replication
P	Promotor
	Pufferkontrolle
pBS	Plasmidvektor Bluescript
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl., Polymerase Chain Reaction)
PD	<i>ycf1</i> PDa -Pflanzenprobe
PEG	Polyethylenglykol

PEP	plastomkodierte RNA-Polymerase (engl. plastid-encoded polymerase)
PEP12	putatives 12 Aminosäuren großes Peptid
PFGE	Pulsfeldgelelektrophorese
PGT	Plastidäre GT(-haltige Sequenz)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H⁺ -Konzentration
Plant J	The Plant Journal
Plant Mol Biol (Rep)	Plant Molecular Biology (Reporter)
Plant Physiol	Plant Physiology
Plastom	Plastidengenom
PMSF	Phenylmethylsulfonylfourid
PNAS	Proceedings in National Academic Science USA
<i>psb</i>	Photosystem II-Gen
psi	Einheit für Druck (engl., pressure)
<i>Pst</i>	<i>Providencia stuarti</i>
PVDF	Polyvinylidendiflourid
<i>Pvu</i>	<i>Proteus vulgaris</i>
Q _A	Plastochinon A (im Photosystem II, engl. plastoquinone)
®	registered
R	Purin (ATP oder GTP)
RAR	repair and recombination
RB	Rich Broth
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
RGS•	Aminosäurefolge: R= Arginin , G= Glycin und S= Serin
RNA	Ribonukleinsäure (engl., ribonucleic acid)
RNase	Ribonuklease
rNTP	Ribonukleosid-5'-triphosphat
<i>rbc</i>	Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase-Gen
<i>rpl</i>	Gen für ribosomales Protein der großen (large) Untereinheit
<i>rpo</i>	RNA-Polymerase-Gen
Rpo	RNA-Polymerase-Protein (NEP)
<i>rps</i>	Gen für ribosomales Protein der kleinen (small) Untereinheit
rRNA	ribosomale RNA
<i>Sac</i>	<i>Streptomyces achromogenes</i>
SB	storage buffer
<i>Sca</i>	<i>Streptomyces caespitosus</i>
SD	Shine-Dalgarno
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl., sodiumdodecylsulfate)
sec	Sekunden (Latein, secundus/i)
SLS	Natrium-N- Laurylsarkosin (engl., sodium-N-laurylsarcosine)
<i>Spe</i>	<i>Sphaerotilus species</i>
SSC	kleine Einzelkopie-Region (engl., small single copy) Natriumcitrat (engl., Standard Sodium Citrate)
t	Zeit (engl., time)
T	Terminator
	Thymidin
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>

TBE	Tris/ B orsäure/EDTA (-haltiger Puffer)
TBS	Tris b uffered saline
TCA	Trichloracetat
TEMED	T etramethylethylendiamin
TFB	t ransformation b uffer
TM	Markenzeichen (engl., T rade M ark)
T _m	Schmelztemperatur (engl., m elting temperature)
Trends Genet	T rends in G enetics
Tris	T ris(hydroxymethyl)aminomethan
<i>trn</i>	t RNA-Gen
tRNA	transfer RNA
TTP	Thymidin-5'- t riphosphat
u	Einheit der Enzymaktivität (engl., u nit)
U	Uridin
usw.	u nd so weiter
UTP	Uridin-5'- t riphosphat
UTR	u ntranslatierte R egion (einer mRNA)
UV	u ltraviolett
Ü	Ü berstand
Üy1	ü berexprimiertes Protein
V	Ü berexpressionskonstrukt von <i>ycf1</i>
var.	Volt (Einheit der Spannung)
WT	V arietät
<i>Xba</i>	W ildtyp
X-Gal	<i>Xanthomonas badrii</i>
<i>Xma</i>	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-D- g alactopyranosid
Y	<i>Xanthomonas malvacearum</i>
<i>ycf</i>	Pyrimidin (CTP oder TTP)
<i>ycf1</i> PDa	hypothetical chloroplast reading frame (Genname)
z.B.	<i>ycf1</i> mit Promotor von <i>psbD</i> und <i>aadA</i> -Kassette zum B eispiel