

Charakterisierung essentieller Faktoren des Nukleinsäuremetabolismus von Chloroplasten: MatK und P67

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Diplom-Biologe Reimo Zoschke
geboren am 22.03.1979 in Potsdam

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin
Prof. Dr. Dr. h.c. Christoph Marksches

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Prof. Dr. Lutz-Helmut Schön

Gutachter:

1. Prof. Dr. Schmitz-Linneweber
2. Prof. Dr. Wolfgang R. Hess
3. PD Dr. Udo Schmidt

Tag der mündlichen Prüfung: 04.05.2010

Strebe nicht, alles zu wissen, damit du nicht in allem unwissend wirst.

Demokrit

Zusammenfassung

Die chloroplastidäre Genexpression ist durch charakteristische posttranskriptionelle Ereignisse, wie RNA-Prozessierung, RNA-Stabilität, RNA-Edierung oder RNA-Spleißen gekennzeichnet. Diese Prozesse werden fast ausnahmslos durch kernkodierte Proteine realisiert. PPR-Proteine (Pentatricopeptid *repeat*) stellen unter diesen kernkodierten Faktoren die größte Proteinfamilie dar.

Das plastidäre Protein P67 gehört zur kleinen Untergruppe der PPR-Proteine mit SMR-Domäne (*small MutS-related*), deren molekulare Funktion im organellären Nukleinsäuremetabolismus bislang unverstanden ist. P67 zeigt eine nahe Verwandtschaft zu GUN1, einem zentralen Bestandteil retrograder Signalwege. Der hier analysierte *P67*-Knockout in Mais verursacht hellgrüne Phänotypen, eine drastische Reduktion der plastidären ATPase und Keimlingsletalität, was die essentielle Beteiligung von P67 an den Prozessen der Chloroplastenbiogenese und der Expression der plastidär kodierten ATPase-Untereinheiten vermuten lässt. Mögliche Implikationen eines fehlenden Phänotyps von Mutanten des *P67*-Orthologs aus *Arabidopsis thaliana* werden diskutiert.

Eine Ausnahmestellung unter den Proteinen des chloroplastidären RNA-Metabolismus nimmt der einzige plastidär kodierte RNA-Reifungsfaktor MatK ein. Die genomische Position des *matK*-Gens im Intron der tRNA^{Lys}(UUU) ist in allen grünen Landpflanzen konserviert. MatK ist mit bakteriellen Maturasen verwandt, die spezifisch den Spleißprozess ihres Heimatintrons unterstützen. Dagegen deuten genetische und phylogenetische Studien zusätzliche MatK-Funktionen *in trans* an. In der vorliegenden Arbeit wird die spezifische Interaktion von MatK mit sieben Gruppe-IIA-Intron enthaltenden Transkripten *in vivo* gezeigt. Darunter befinden sich vier tRNA-Vorläufer (*trnK*-UUU mit dem *matK*-Heimatintrom sowie *trnV*-UAC, *trnI*-GAU, *trnA*-UGC) und drei proteinkodierende Vorläufertranskripte (*rpl2*, *rps12*, *atpF*). Die Feinkartierung der MatK-Bindung im *trnK*-Heimatintrom zeigt eine Assoziation mit multiplen Regionen. Organelläre Gruppe-II-Introns gelten als Vorläufer der spleißosomalen Introns. Die Assoziation mit multiplen Gruppe-II-Introns macht MatK somit zu einem interessanten Modell für die Evolution der transaktiven Spleißaktivität im Kern. Analysen der Expression von MatK und seinen Zielen deuten auf ein komplexes Muster möglicher regulativer Interaktionen hin.

Schlagnworte: Chloroplast, Gruppe-II-Intron-Maturase, RNA-Bindeprotein, PPR-Protein

Abstract

Chloroplast gene expression is characterized by posttranscriptional events including RNA cleavage, RNA stability, RNA editing, and RNA splicing. The underlying processing machinery is almost exclusively encoded in the nucleus. PPR proteins (pentatricopeptide repeat) form the biggest protein family among these factors and are major players of the aforementioned posttranscriptional processes.

The plastidial protein P67 is a member of a small subgroup of PPR proteins with SMR domain (small MutS-related). Molecular functions of this protein family in organellar nucleic acid metabolism are yet unknown. P67 is a close relative of GUN1, an essential component of the chloroplast to nucleus retrograde signalling pathway. It is shown here that a *P67* knockout in maize causes pale green phenotypes, a dramatic reduction in ATPase levels, and seedling lethality. This indicates an essential role of P67 for chloroplast biogenesis and expression of the plastid encoded ATPase. The finding that mutants of the *P67*-orthologue in *Arabidopsis* lack a phenotype is discussed against the background of physiological differences between maize and *Arabidopsis*.

A special case among proteins involved in plastid RNA metabolism is MatK - the only plastid encoded RNA maturation factor. The genomic position of the *matK* gene in the tRNA^{Lys}(UUU) intron is conserved throughout autotrophic land plants. MatK is related to bacterial maturases - highly specific splice factors supporting splice processes of their respective home introns. There is, however, indirect genetic and phylogenetic evidence that MatK acts also *in trans* as a common plastidial splice factor serving various group II introns. This study shows that MatK interacts specifically with seven group IIA introns *in vivo*. Among them are four tRNA precursor transcripts (*trnK*-UUU including the *matK* home intron as well as *trnV*-UAC, *trnI*-GAU, *trnA*-UGC) and three protein-coding precursors (*rpl2*, *rps12*, *atpF*). Fine mapping of MatK binding sites within the *trnK* home intron uncovers protein RNA interactions with diverse intron regions. Organellar introns have been suggested as evolutionary ancestors of nuclear spliceosomal introns. Consequently, association of MatK with multiple group II intron ligands makes the plastidial maturase an attractive model for an early *trans*-acting nuclear splice activity. Analyses of the expression of MatK and its targets revealed a complex pattern of possible regulatory interactions.

Keywords: Chloroplast, Group II Intron Maturase, RNA Binding Protein, PPR-Protein

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Abstract	II
Inhaltsverzeichnis	III
1 Einleitung.....	1
1.1 Plastidäre Genexpression und deren Regulation	1
1.1.1 Das Plastom	1
1.1.2 Transkription.....	3
1.1.3 Posttranskriptionelle Prozesse	3
1.1.3.1 Prozessierung, Stabilität und Degradation	3
1.1.3.2 Edierung	4
1.1.3.3 Spleißen.....	4
1.1.4 Translation	6
1.2 Maturasen und MatK	7
1.2.1 Struktur und Spleißprozess von Gruppe-II-Introns.....	7
1.2.2 Plastidäre Gruppe-II-Introns	10
1.2.3 Vorkommen und Aufbau von Maturasen	11
1.2.4 Maturasen und <i>Retrohoming</i>	12
1.2.5 Maturasefunktion beim Spleißen von Gruppe-II-Introns	13
1.2.6 MatK: Ein polyspezifischer Spleißfaktor?.....	13
1.2.7 Potentielle Gründe der <i>matK</i> -Konservierung auf dem Plastom... 15	
1.2.8 Regulation der Expression von Gruppe-II-Intron-Maturasen..... 16	
1.2.9 Evolution von Gruppe-II-Introns und Maturasen	17
1.3 PPR-Proteine und P67	19
1.3.1 Eine Familie, viele Funktionen.....	19
1.3.2 P67: Ein PPR-Protein mit SMR-Domäne	22
1.4 Zielstellung	24
2 Material und Methoden.....	25
2.1 Material.....	25
2.1.1 Pflanzenmaterial	25
2.1.2 Bakterienstämme.....	25
2.1.3 Antikörper, Vektoren und Oligonukleotide	25
2.1.4 Medien	25
2.1.4.1 Pflanzenmedien	25

Inhaltsverzeichnis

2.1.4.2	Bakterienmedien	26
2.1.5	Standardpuffer und -lösungen.....	26
2.1.6	Software	26
2.1.7	Sonstige Materialien	27
2.1.8	Anbieter.....	27
2.2	Methoden	27
2.2.1	Pflanzenanzucht	27
2.2.2	Oberflächensterilisation von Pflanzensamen.....	28
2.2.3	Sterilisation von Lösungen, Geräten und GVO	28
2.2.4	Plastidentransformation	28
2.2.5	Chloroplastenisolation, Stroma- und Membranextraktion.....	29
2.2.6	Messungen physiologischer Parameter der Photosynthese.....	29
2.2.7	Identifikation von Mu-Insertionslinien (<i>Mu-Screen</i>).....	30
2.2.8	Isolation und Reinigung von Nukleinsäuren, Sequenzierung.....	30
2.2.8.1	DNA-Extraktion.....	30
2.2.8.2	Plasmidpräparation.....	30
2.2.8.3	Reinigung von DNA-Fragmenten, Sequenzierung	31
2.2.8.4	RNA-Extraktion	31
2.2.8.5	Quantifizierung und Qualitätskontrolle.....	31
2.2.9	Elektrophorese und Transfer von Nukleinsäuren	31
2.2.9.1	DNA-Gelelektrophorese	31
2.2.9.2	DNA-Transfer (Southern-Transfer)	32
2.2.9.3	Herstellung von <i>Macroarrays</i>	32
2.2.9.4	Herstellung von <i>Microarrays</i>	32
2.2.9.5	RNA-Gelelektrophorese.....	33
2.2.9.6	RNA-Transfer (Northern-Transfer)	34
2.2.10	Markierung von DNA-Sonden.....	34
2.2.11	Hybridisierung und Detektion von DNA-Sonden.....	34
2.2.12	Isolation von Proteinen	35
2.2.13	Quantifizierung von Proteinlösungen	35
2.2.14	Elektrophorese und Transfer von Proteinen	35
2.2.14.1	Denaturierende Protein-Gelelektrophorese.....	35
2.2.14.2	Protein-Transfer (Western-Transfer)	36
2.2.15	Immunodetektion	37
2.2.16	Immunopräzipitationen.....	37
2.2.17	Analyse von RNA und DNA aus Immunopräzipitationen	38
2.2.17.1	RIP-Chip, DIP-Chip.....	38

2.2.17.2	Reverse Transkription in radioaktiv markierte cDNA	39
2.2.17.3	Transfer auf Nylonmembranen (<i>Slot-Blot</i>)	39
2.2.18	Massenspektrometrie	40
2.2.19	Bakterienanzucht.....	40
2.2.20	Transformation chemisch kompetenter <i>E.-coli</i> -Zellen	40
2.2.21	Heterologe Expression rekombinanter Polypeptide in <i>E. coli</i>	40
2.2.22	Reinigung des P67-Antiserums.....	41
2.2.23	Analyse der MatK-Expressionsregulation in <i>E. coli</i>	41
2.2.24	PCR.....	41
2.2.25	Reverse Transkription.....	41
2.2.26	Verwendung von Restriktionsendonukleasen.....	41
3	Ergebnisse.....	42
3.1	Charakterisierung der putativen plastidären Maturase MatK.....	42
3.1.1	Markierung von <i>matK</i> mit der HA-Epitopsequenz.....	42
3.1.2	Segregationsstatus der transplastomischen Pflanzen.....	43
3.1.3	Phänotypen der homoplastomischen Pflanzen.....	45
3.1.4	MatK ist ein Stromaprotein.....	46
3.1.5	MatK wird speziell in jungen, grünen Organen exprimiert	47
3.1.6	Epitopbasierte MatK-Immunopräzipitation	48
3.1.7	Spezifische MatK-Assoziation mit sieben Gruppe-IIA-Introns ..	49
3.1.8	MatK-Assoziation mit verschiedenen <i>trnK</i> -Introndomänen.....	52
3.1.9	Untersuchungen zur Regulation der MatK-Expression	54
3.1.10	Expression der MatK-Ziele.....	57
3.1.11	Experimente zum Funktionsnachweis von MatK.....	67
3.2	Charakterisierung des PPR-SMR-Proteins P67.....	70
3.2.1	Identifikation von <i>P67</i> -Insertionsmutanten	70
3.2.1.1	<i>P67</i> -Insertionslinien in Mais	70
3.2.1.2	<i>P67</i> -Insertionslinien in <i>Arabidopsis</i>	74
3.2.2	Knockout der <i>P67</i> -Expression in Mais-Insertionslinien	75
3.2.3	<i>P67</i> -Expression in <i>Arabidopsis</i> -Insertionslinien	77
3.2.4	<i>P67</i> -Immunopräzipitation	78
3.2.5	<i>P67</i> und retrogrades <i>Signalling</i>	79
3.2.6	Stark reduzierte AtpB-Akkumulation durch <i>ZmP67</i> -Knockout ..	80
4	Diskussion.....	82
4.1	MatK: Eine Maturase als polyspezifischer Spleißfaktor	82
4.2	MatK assoziiert mit multiplen Intronbereichen.....	85

Inhaltsverzeichnis

4.3 MatK und das plastidäre „Spleißosom“	89
4.4 MatK-Expression: Regulative Implikationen	91
4.4.1 MatK: Ein Regulator der plastidären Genexpression?.....	92
4.4.2 MatK und seine mögliche Autoregulation	95
4.5 P67: Putative Funktionen eines PPR-SMR-Proteins	97
4.5.1 P67-Mutation: Phänotypische Divergenz in Mais/ <i>Arabidopsis</i> ..	98
4.5.2 Einflüsse von P67 auf die Expression der plastidären ATPase .	100
Literatur	103
Anhang.....	120
Abkürzungen.....	130
Danksagung.....	133
Lebenslauf	134
Selbstständigkeitserklärung	137

1 Einleitung

Plastiden sind das charakteristische Organell der Pflanzenzelle. Sie treten in verschiedenen Erscheinungsformen in den Gewebetypen der Pflanze auf. Den mit Abstand prominentesten und molekularbiologisch am besten charakterisierten Plastidentyp stellen die photosynthetisch aktiven Chloroplasten dar.

Plastiden und Mitochondrien sind Nachkommen endosymbiotischer Bakterien (Gray, 1999; Margulis, 1970; Martin et al., 2001). Die Endosymbiontentheorie geht von seriellen Ereignissen der Endosymbiose aus, wobei vor 2,2 - 1,5 Mrd. Jahren ein α -Proteobakterium als Vorfahr der Mitochondrien und vor 1,5 - 1,2 Mrd. Jahren ein Vorgänger heutiger Cyanobakterien als Vorläufer der Chloroplasten integriert wurden (zusammengefasst in Kutschera und Niklas, 2004). Im Ergebnis interagieren und koevolvieren drei genetische Systeme in pflanzlichen Zellen, zum einen das nukleäre und zum anderen zwei zytoplasmatische in Mitochondrien und Plastiden.

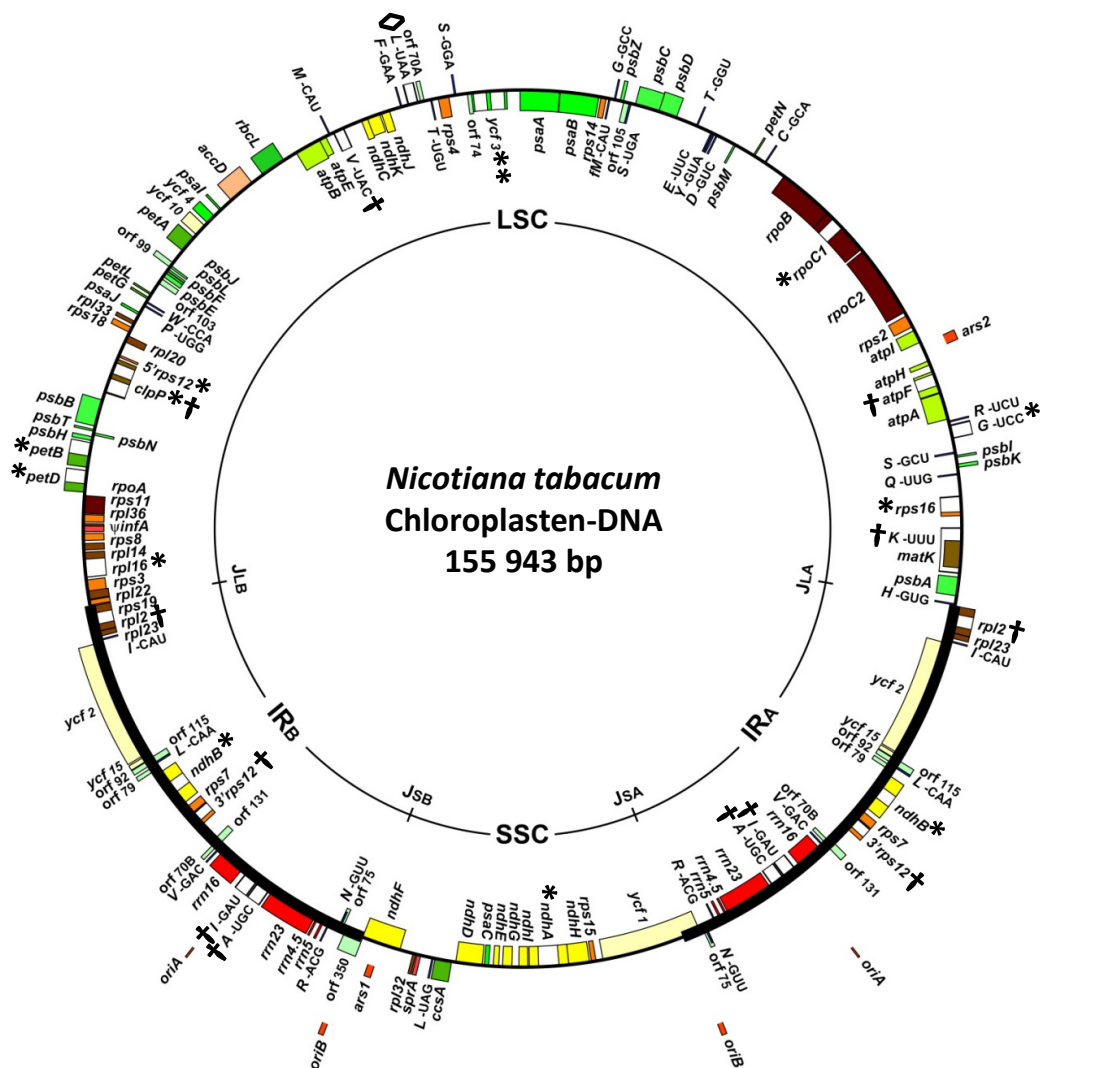
1.1 Plastidäre Genexpression und deren Regulation

Die Genexpression der Plastiden ist von kern- und organellkodierten Proteinen abhängig und zeigt sowohl prokaryotische (z.B. Transkription) als auch eukaryotische Charakteristika (z.B. RNA-Edierung). Ihre Regulation muss konzertiert mit der Expression kernkodierter plastidär lokalisierter Proteine stattfinden und ist vornehmlich auf posttranskriptioneller und translationeller Ebene realisiert (zusammengefasst z.B. in Bock, 2007).

1.1.1 Das Plastom

Die Matrize und damit die Basis der plastidären Genexpression ist das Plastidengenom (Plastom). Während der Evolution vom Endosymbionten zu den Chloroplasten rezenter Arten kam es zu einem massiven Verlust genetischer Information im Organell (Überblick in Timmis et al., 2004). Die Ursachen dafür liegen in einem ausgeprägten Transfer ehemaliger Endosymbiontengene in das Kerngenom sowie dem Verlust funktionell redundanter Gene (Martin et al., 2002; Stegemann et al., 2003). Dementsprechend wird die Mehrzahl der plastidären Proteine posttranslationell aus dem Zytoplasma in die Chloroplasten importiert. Die Plastome der grünen Landpflanzen haben eine durchschnittliche Größe von rund 150 kb und liegen als ringförmige oder lineare Strukturen

in vielen Kopien vor (z.B. Bendich, 2004; Herrmann et al., 1975; Zoschke et al., 2007). Plastidengenome sind im Allgemeinen in zwei Kopien invertierter Sequenzregionen (*inverted repeats*, IR) und zwei Einzelkopiebereiche gegliedert (*large- und small single copy region*, LSC und SSC, s. Abb. 1). Sie kodieren rund 100 - 200 Gene der Genexpression und Photosynthese. Die Gene sind mehrheitlich in Operons organisiert, z.T. durch Introns unterbrochen und überlappen selten (Daniell und Chase, 2004).



- | | | |
|--------------------------------|---|--|
| ■ RNA-Polymerase | ■ Photosystem I/II | ■ MatK, ClpP |
| ■ Ribosomale RNAs | ■ Cytochrom- <i>b₆f</i> -Komplex | □ Introns (Gruppe: I =◇, IIA = †, IIB = *) |
| ■ Ribosomale Proteine (gr. UE) | ■ ATPase | □ Hyp. chloropl. Leserahmen (ycf) |
| ■ Ribosomale Proteine (kl. UE) | ■ NADH-Dehydrogenase | □ Offene Leserahmen (ORF) |
| ■ Transfer-RNAs | ■ RubisCO (gr. UE) | |

Abb. 1: Genkarte des Plastoms von Tabak (verändert nach Wakasugi et al., 2001).

1.1.2 Transkription

Plastiden nutzen eine Bakterientyp-RNA-Polymerase, bestehend aus fünf Kernuntereinheiten ($2 \times \alpha$, β , β' , β'' ; PEP, plastidär kodiert) und einem von mehreren Sigmafaktoren (kernkodiert), sowie die kernkodierte Transkriptionsaktivität NEP mit Ähnlichkeiten zu RNA-Polymerasen aus T3-/T7-Phagen (RpoTp bzw. -Tp/-Tmp, Mono- bzw. Eudikotyledonen, Überblick in Liere und Börner, 2007). Der Transkriptionskomplex enthält zahlreiche nukleär kodierte Proteine, unter denen sich auch ein Vertreter der Pentatricopeptid-*Repeat*-Proteinfamilie befindet (pTAC2, Pfalz et al., 2006).

Sowohl die differentielle Nutzung multipler Promotoren als auch deren durch endo- und exogene Faktoren getriebene Aktivierung (z.B. Licht) sowie die Arbeitsteilung zwischen NEP- und PEP-Enzymen während der Chloroplastenentwicklung tragen zur Regulation der plastidären Genexpression bei (Übersicht in Liere und Börner, 2007).

1.1.3 Posttranskriptionelle Prozesse

Bei der Regulation der plastidären Genexpression kommt posttranskriptionellen Prozessen eine Schlüsselfunktion zu. Das Prozessieren polycistronischer RNAs, die Steuerung der Transkriptstabilität sowie Edierung und Spleißen tragen erheblich zur Dynamik der Genexpression in Chloroplasten bei. An diesen Prozessen partizipieren vornehmlich kernkodierte Proteine, unter denen die PPR-Proteine eine große Familie stellen (Pentatricopeptid-*Repeat*-Proteine, s. Kap. 1.3, Überblick in Bock, 2007; del Campo, 2009).

1.1.3.1 Prozessierung, Stabilität und Degradation

Das Prozessieren polycistronischer Vorläufer-RNAs zu oligo- und monocistronischen Transkripten, die Reifung der Transkriptenden sowie RNA-Degradation bzw. -Stabilität sind charakteristische posttranskriptionelle Aktivitäten in Chloroplasten (Übersicht in Bollenbach et al., 2007). Die intercistronische Prozessierung wird durch spezifische Endonukleasen und eventuell auch PPR-Proteine realisiert (Bollenbach et al., 2007; Nakamura und Sugita, 2008). Daneben kann die protektive Funktion von PPR-Proteinen vor unspezifischen Nukleasen eine Prozessierung bewirken (Pfalz et al., 2009). Reife 5'-Transkriptenden entstehen transkriptionell bzw. wie reife 3'-Transkriptenden nach Prozessierung durch Nukleasen (Bollenbach et al., 2007). Die RNA-Degradation erfolgt durch endonukleolytische Schnitte in der 3'-nichttranslatierten Region (3'-UTR), fol-

gende 3'-Polyadenylierung und 3'-5'- bzw. 5'-3'-exonukleolytischen Abbau (Übersicht in Bollenbach et al., 2007; Lange et al., 2009). Stabilisierend wirken *cis*-Elemente in 3'- und 5'-UTR sowie Transfaktoren. Zu diesen gehören translatierende Ribosomen sowie schützende Faktoren mit schwacher Spezifität (cpRNPs, Nakamura et al., 2001) und hochspezifische Protektionsfaktoren, unter denen eine große Gruppe den PPR-Proteinen zuzurechnen ist (z.B. PPR5, Beick et al., 2008; PPR10, Pfalz et al., 2009).

1.1.3.2 Edierung

RNA-Edierung ist ein typischer Schritt der plastidären Genexpression. Dabei werden spezifische Nukleotide von C nach U, seltener von U nach C oder von A nach I konvertiert (Karcher und Bock, 2009; Schmitz-Linneweber und Barkan, 2007). In den Chloroplasten der Samenpflanzen sind ca. 30 - 40 C-nach-U-Transitionen bekannt, die meist in kodierenden Bereichen stattfinden und häufig zur Restauration konservierter, z.T. für die Proteinfunktion essentieller, Aminosäuren führen (Bock et al., 1994; Tillich et al., 2006). Erforderlich für die Edierungsaktivität sind sowohl *cis*-Sequenzen als auch Transfaktoren. Die bekannten *cis*-Sequenzen können, Sequenzhomologien folgend, in kleine Gruppen eingeteilt werden, die durch gemeinsame Transfaktoren bedient werden (Schmitz-Linneweber und Barkan, 2007). Die analysierten Transfaktoren sind kernkodiert und werden von Vertretern der PPR-Proteinfamilie dominiert (Übersicht in Hammani et al., 2009). Es handelt sich vermutlich um Spezifitätsfaktoren, die die edierende Aktivität zu den Edierungsstellen leiten (Schmitz-Linneweber und Barkan, 2007). Als Edierungsenzyme werden Cytidin-De- oder -Transaminasen bzw. PPR-Proteine mit zusätzlichen Domänen vermutet (z.B. DYW-Domäne, Schmitz-Linneweber und Barkan, 2007). Mit der tRNA-Adenosin-Deaminase-Arginin ist eine A-nach-I-Edierungsaktivität bekannt (Delannoy et al., 2009; Karcher und Bock, 2009).

1.1.3.3 Spleißen

In den Plastomen der nichtparasitären Angiospermen sind 15 bzw. 17 Gene durch ein oder mehrere Introns unterbrochen, dies sind neben einem Gruppe-I-Intron 17 bzw. 20 Gruppe-II-Introns (Mono- bzw. Eudikotyledonen; s. Abb. 1 und Abb. 2; Überblick in Schmitz-Linneweber und Barkan, 2007). Daneben wurden in den Chloroplasten der Euglenoiden degenerierte Gruppe-II-Introns, sogenannte Gruppe-III-Introns, gefunden,

die z.T. ineinander verschachtelt sind (Twintrons) und sequentiell, beginnend mit dem inneren Intron, gespleißt werden (Überblick in Lambowitz und Zimmerly, 2004). Da plastidäre Introns Gene der Photosynthese- und der Genexpressionsmaschinerie unterbrechen, ist das akkurate Spleißen essentiell für die Chloroplastenbiogenese. Ein regulativer Einfluss des Spleißens auf die plastidäre Genexpression wird diskutiert, ist aber bisher kaum untersucht (Schmitz-Linneweber und Barkan, 2007). Als Beispiel können hier das lichtaktivierte Spleißen der *psbA*-Vorläufer in *Chlamydomonas* oder die Abhängigkeit der Spleißaktivität vom Gewebetyp für verschiedene Transkripte in Mais genannt werden (Barkan, 1989; Deshpande et al., 1997).

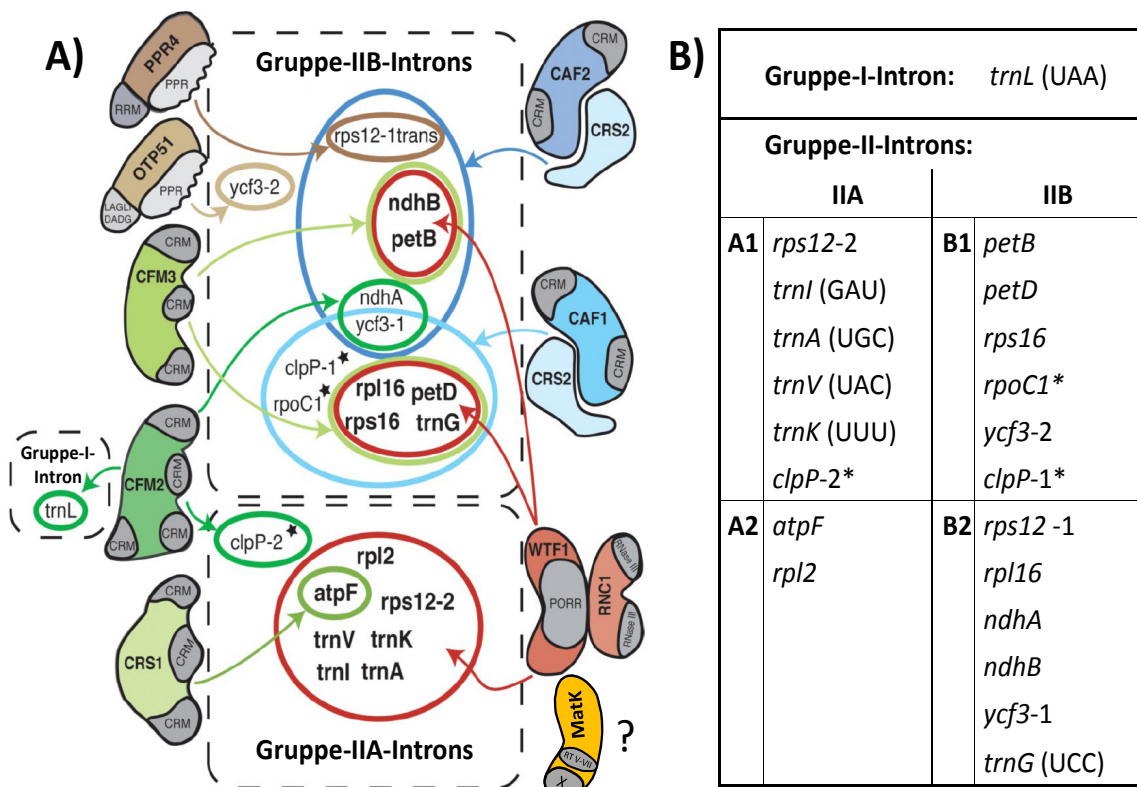


Abb. 2: Plastidäre Introns und bekannte Spleißfaktoren der Angiospermen. Sterne (*) markieren spezifische Introns von *Arabidopsis* und Tabak, die Mais und Gerste fehlen. Ziffern indizieren die Position bei Genen mit mehreren Introns. A) Spleißfaktoren und ihre Ziel-RNAs (verändert nach Kroeger et al., 2009). Die Spleißfaktoren sind mit ihren konservierten Domänen gezeigt. Sofern analysiert, sind die Funktionen zwischen Mono- und Eudikotyledonen konserviert. Assoziierte Spleißfaktoren sind gepaart dargestellt (z.B. WTF1/RNC1). Ziel-RNAs von MatK sind nicht analysiert. Nicht aufgeführt sind folgende Spleißfaktoren (und ihre Ziel-RNAs): WHY1 (*atpF*), HCF152 (*petB*), OTP51 (*atpF*, *trnV*, *trnK*). B) Übersicht über Gruppen und Untergruppen plastidärer Introns der Angiospermen (verändert nach Michel et al., 1989).

Für keines der plastidären Introns in Gefäßpflanzen konnte bisher das, für Gruppe-I- und -II-Intron-Ribozyme eigentümliche, autokatalytische Spleißen *in vitro* gezeigt werden. Somit sind in den Plastiden Proteinkofaktoren, sogenannte Spleißfaktoren, für einen effizienten Spleißprozess essentiell (Überblick in Schmitz-Linneweber und Barkan, 2007). Im Gegensatz zu den meisten posttranskriptionellen Prozessen, die ausschließlich von nukleär kodierten Faktoren realisiert werden, ist mit der Maturase K ein plastidär kodierter Kandidat für einen Spleißfaktor bekannt (MatK, s. Kap. 1.2). Daneben ist für jedes der plastidären Introns mindestens ein kernkodierter Spleißfaktor beschrieben (s. Abb. 2). Unter diesen Spleißfaktoren sind PPR-Proteine mit ungewöhnlichen Domänen (OTP51 bzw. PPR4 mit LAGLIDADG- bzw. RRM-Domäne, RNA-*recognition motif*) sowie Proteine mit CRM-Domänen (*chloroplast RNA splicing and ribosome maturation*, CAF1/2, CFM1/2, CRS1), ein Protein mit PORR-Domäne (*plant organelle RNA recognition*, WTF1), eines mit RNaseIII-Domäne (RNC1) und ein Protein mit Ähnlichkeit zu Peptidyl-tRNA-Hydrolasen vertreten (CRS2). Plastidäre Spleißfaktoren wurden in großen Ribonukleoproteinkomplexen gefunden (mehrere hundert kDa), die mindestens gleichviel Protein wie RNA enthalten und in ihrer Komplexität an Spleißosomen oder Ribosomen erinnern (Kroeger et al., 2009). Für einige der genannten Spleißfaktoren ist die direkte, wechselseitige Interaktion gezeigt bzw. sehr wahrscheinlich (CRS2 und CAF1/CAF2 bzw. WTF1 und RNC1, s. Abb. 2).

1.1.4 Translation

Der plastidäre Translationsapparat ist dem der bakteriellen Vorfahren weitestgehend ortholog (Überblick in Marín-Navarro et al., 2007). rRNAs und tRNAs sind plastidär kodiert, tRNA-Synthetasen und die meisten ribosomalen Proteine sind kernkodiert. Trotz der Orthologie der Ribosomen besitzt die Mehrheit der plastidären Gene in Tabak keine Shine-Dalgarno-Sequenz (Sugiura et al., 1998). Neben positiv und negativ regulierenden *cis*-Elementen in 5'- und wahrscheinlich auch 3'-UTR sind kernkodierte unspezifische und spezifische Transfaktoren der Translation bekannt, darunter mindestens ein PPR-Protein (CRP1, Übersicht in Wobbe et al., 2008). Die durch endo- und exogene Faktoren (z.B. Licht) gesteuerte Translation ist gezeigt (z.B. *psbA*) und eine assembleeabhängige Autoregulation der Translation von Untereinheiten der Photosystemkomplexe ist, zumindest in *Chlamydomonas*, üblich (Marín-Navarro et al., 2007).

1.2 Maturasen und MatK

Gruppe-I- und -II-Introns sind als *in vitro* selbstspleißend beschrieben worden. Da diese Reaktionen oft unter unphysiologischen Bedingungen (hohe Salzkonzentration bzw. Temperatur) bzw. sehr langsam ablaufen, sorgen *in vivo* proteinöse Kofaktoren für einen effizienten Spleißprozess (Überblick in Lambowitz et al., 1999). Diese Spleißfaktoren unterstützen die katalytische Aktivität der Introns (z.B. als RNA-Chaperon oder durch Stabilisierung der katalytisch aktiven Struktur), sind aber selbst nicht an der eigentlichen Spleißreaktion beteiligt. Eine Gruppe von Spleißfaktoren sind intronkodierte Maturasen, die das Spleißen des sie beherbergenden Introns (Heimatintrons) unterstützen, dem Heimatintron z.T. genetische Mobilität verleihen und in Vertretern von Gruppe-I- und -II-Introns gefunden wurden (Lambowitz et al., 1999). Eine andere Gruppe sind sekundär für den Spleißprozess akquirierte Proteine, die nicht im Intron selbst kodiert sind (s. Kap. 1.1.3.3, z.B. CRM-Domänen-Proteine oder Peptidyl-tRNA-Hydrolasen).

1.2.1 Struktur und Spleißprozess von Gruppe-II-Introns

Gruppe-I- und -II-Introns unterscheiden sich grundsätzlich in Struktur und Spleißmechanismus. Während Gruppe-I-Introns in ihrer Sekundärstruktur neun gepaarte Regionen aufweisen (P1 - P9, in drei helikalen Domänen: P1-2, P4-5-6, P3-7-8-9) und für den Spleißprozess ein freies Guanosin als Kofaktor benötigen (zusammengefasst in Woodson, 2005), zeichnen sich Gruppe-II-Introns durch sechs gepaarte Hauptdomänen aus, die von einem zentralen Rad ausstrahlen (DI - DVI). Für ihren Spleißprozess wird ein spezifisches Adenosin der Intronsequenz oder H₂O genutzt (Lambowitz und Zimmerly, 2004; Podar et al., 1998; s. Abb. 3, Abb. 4). Beide Introngruppen bilden über kurze Basenpaarungen ausgeprägte Tertiärstrukturen, die für die Katalyse des Spleißprozesses essentiell sind (s. Abb. 4). Gruppe-II-Introns lassen sich aufgrund von Sekundär- und Tertiärstruktur-Unterschieden in mindestens drei Untergruppen und weitere Subtypen einteilen (IIA, IIB, IIC, s. Abb. 4, Lambowitz und Zimmerly, 2004). Trotz der strukturellen und mechanistischen Unterschiede ist der chemische Prozess des Spleißens in Gruppe-I- und -II-Introns im Allgemeinen durch zwei Transester-Reaktionen gekennzeichnet, die zweiwertige Kationen (Mg²⁺) und nukleophile OH-Gruppen (3'- bzw. 2'-OH-Gruppen) aber keine energieliefernden Kofaktoren benötigen (s. Abb. 3).

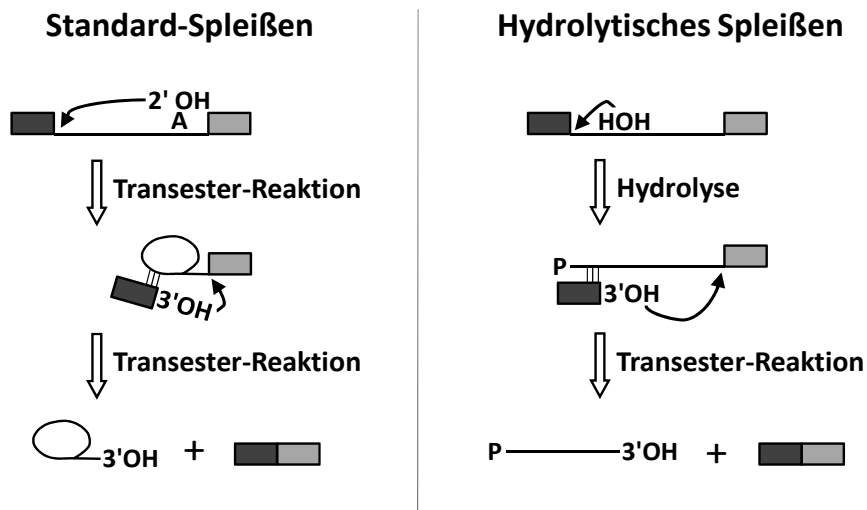


Abb. 3: Spleißwege von Gruppe-II-Introns. Links: Standard-Spleißen über zwei Transester-Reaktionen mit der Freisetzung des Introns als *Lariat*. Rechts: Spleißen durch Hydrolyse und Transester-Reaktion, wobei das Intron als lineares Molekül freigesetzt wird (Details siehe Text).

Bei Gruppe-II-Introns beginnt der Spleißprozess im Allgemeinen mit einem nukleophilen Angriff der 2'-OH-Gruppe eines spezifischen ausgewölbten Adenosinrestes des Introns (DVI, *bulged A*) auf die Phosphodiesterbindung der 5'-Spleißstelle (s. Abb. 3 und Abb. 4, Lambowitz und Zimmerly, 2004). Die 3'-5'-Phosphodiesterbindung der 5'-Spleißstelle wird gelöst und gleichzeitig eine neue 2'-5'-Phosphodiesterbindung zwischen dem *bulged A* und dem 5'-Ende des Introns gebildet. Über Basenpaarungen bleibt das 5'-Exon mit dem Rest des Vorläufertranskripts verbunden (IBS1/2 und EBS1/2, *Intron-* und *Exon-binding sites*, s. Abb. 3 und Abb. 4). Das Intron liegt in einer Lassostruktur (*Lariat*) verbunden mit dem 3'-Exon vor. Das freie 3'OH-Ende des 5'-Exons startet nun einen nukleophilen Angriff auf die 3'-Spleißstelle, so dass, nach einer weiteren Transester-Reaktion, die Exons verknüpft sind und das Intron als *Lariat* freigesetzt wird. Diese Reaktionen benötigen keine energieliefernden Kofaktoren, da die Anzahl der Phosphodiesterbindungen konstant bleibt. Wird die 5'-Spleißstelle hydrolytisch geöffnet, treten keine *Lariat*-Strukturen auf (Podar et al., 1998). Daneben wurden auch ringförmig geschlossene Introns gefunden (z.B. Li-Pook-Than und Bonen, 2006).

Den Domänen der Gruppe-II-Introns konnten verschiedene Funktionen zugeordnet werden (Überblick in Fedorova und Zingler, 2007). DI ist essentiell für die Katalyse und fungiert, durch seine Basenpaarungen mit anderen Introndomänen und den Exons, als Gerüst der Tertiärstruktur für die Faltung in die katalytisch aktive Struktur (s. Abb. 4).

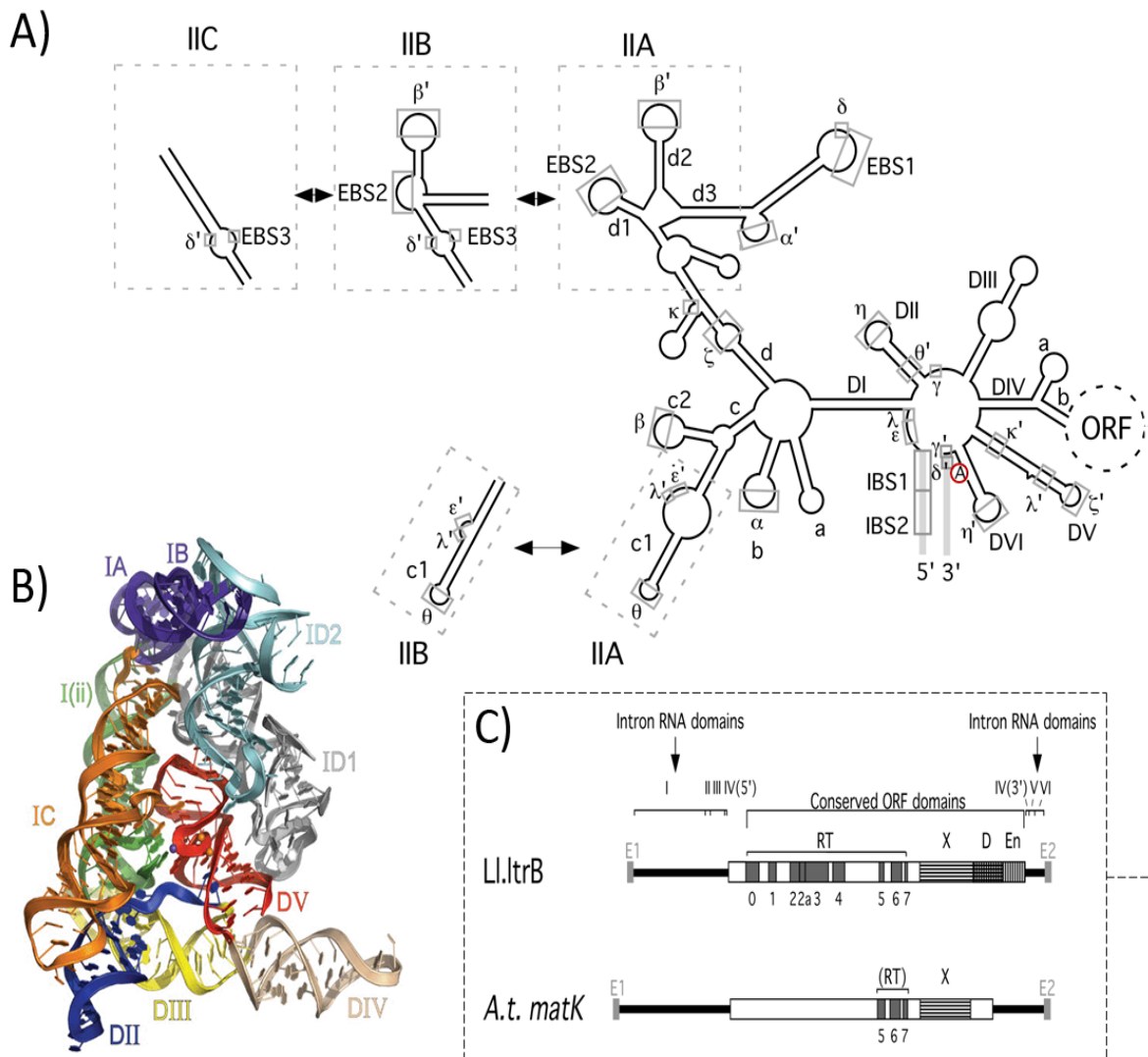


Abb. 4: Konsensussekundärstruktur und Tertiärstruktur von Gruppe-II-Introns und Domänen intronkodierter Proteine. A) Konservierte Sekundärstruktur von Gruppe-II-Introns (aus Lambowitz und Zimmerly, 2004). Gezeigt sind die sechs helikalen Hauptdomänen (DI - DVI, abgehend von einem zentralen Rad) und Subdomänen (z.B. IVa). Intronkodierte Proteine sind in DIV lokalisiert. Griechische Buchstaben zeigen Basenpaarungen der Tertiärstruktur. EBS und IBS = *Exon-* und *Intron-binding sites*. Schlüsselunterschiede der Untergruppen sind eingekastelt. Das *bulged A* ist rot eingekreist. Die Nomenklatur folgt Michel et al. (1989) und Qin und Pyle (1998). B) Tertiärstruktur eines Gruppe-II-Introns (aus Toor et al., 2008). DV (rot) bildet das katalytische Zentrum, die restlichen Domänen sind umschließend angeordnet. C) Proteindomänenstruktur zweier intronkodierter Proteine (verändert nach Lambowitz und Zimmerly, 2004). Schematisch dargestellt sind Intron- und Proteindomänen des L1.LtrB-Introns aus *Lactococcus lactis* (LtrA-Protein) und des trnA^{Lys}(UUU)-Introns aus *Arabidopsis thaliana* (*A.t. matK*). E1 und E2 = 5'- und 3'-Exon. Intron- (DI - DVI) und Proteindomänen sind dargestellt (RT = reverse Transkriptase mit Sequenzblöcken 0 - 7, X = Domäne X, D = DNA-Bindedomäne, En = DNA-Endonukleasedomäne, schwarze Linie = nichtkodierende Bereiche).

Es wurde vorgeschlagen, dass die η - η' -Interaktion zwischen DII und DVI die Konformationsänderung zwischen den beiden Spleißschritten bewirkt. DIII wird als katalytischer Effektor angesehen, da ihre Präsenz nicht essentiell für die Spleißreaktion ist, diese aber beschleunigt. DIV enthält offene Leserahmen für Maturasen, die den Spleißprozess unterstützen. Auch die Bindestellen von Spleißfaktoren (LtrA-Maturase, CRS1) befinden sich in DIV. DV ist die höchstkonservierte Domäne und absolut essentiell für den Spleißprozess. Die jüngst veröffentlichte Kristallstruktur eines selbstspleißenden Gruppe-II-Introns bestätigt, dass DV das katalytische Zentrum bildet, um das sich die anderen Domänen anordnen (s. Abb. 4). DVI enthält das *bulged A*, das den Spleißprozess einleitet.

1.2.2 Plastidäre Gruppe-II-Introns

Alle plastidären Gruppe-II-Introns, bis auf das zweite *clpP*-Intron, existierten wahrscheinlich bereits in einem gemeinsamen Vorfahr der Landpflanzen und Charophyten (Übersicht in Schmitz-Linneweber und Barkan, 2007). Linienspezifische Unterschiede sind demnach durch Verlust von Introns oder intronhaltigen Genen verursacht (z.B. Introns von *clpP*-/*rpoC1* in Einkeimblättrigen oder *ndhA*-/*B* in Schwarzkiefer). Damit gehören Introns zu den am besten konservierten Elementen des Plastoms.

In den Plastidengenomenen der Angiospermen finden sich im Allgemeinen 17 bzw. 20 Gruppe-II-Introns, von denen 7 bzw. 8 als Gruppe-IIA- und 10 bzw. 12 als Gruppe-IIB-Introns klassifiziert sind (Mono- bzw. Eudikotyledonen, Michel et al., 1989). In Chloroplasten spleißen nahezu alle Gruppe-II-Introns über den Standardspleißweg mit *Lariat*-Bildung, lediglich für das Intron der tRNA^{Val}(UAC) sind lineare Introns und das Fehlen eines *bulged A* nachgewiesen, was die Nutzung des hydrolytischen Weges vermuten lässt (Vogel und Börner, 2002). Charakteristisch ist auch die Fragmentierung organellärer Gruppe-II-Introns, die wahrscheinlich aus Rekombinationsereignissen hervorgegangen ist (zusammengefasst in Glanz und Kück, 2009). Teile dieser Introns sind an unterschiedlichen Genompositionen lokalisiert, werden getrennt transkribiert und *in trans* gespleißt. Dies betrifft zum Beispiel in den Plastomen der Embryophyten das erste Intron von *rps12* und in *Chlamydomonas* die *psaA*-Introns 1 und 2, von denen das erste in drei Teile fragmentiert ist und ein großer Intronbereich als eigenständiges Transkript vorliegt. Eine Fragmentierung wurde in den Domänen I - IV gefunden. Die Frag-

mente reassoziieren auf RNA-Ebene mit Hilfe von Spleißfaktoren und formen das katalytische Zentrum des Introns. Dieser ungewöhnliche Spleißprozess führt nach dem ersten Spleißschritt zu γ -förmigen Intronstrukturen.

Wenig ist über den Abbau von Gruppe-II-Introns bekannt. Da freie Introns über eine Transester-Reaktion bereits gespleißte RNA wieder öffnen können (SER, *spliced exon reopening*, Jarrell et al., 1988), scheint es wichtig, einen raschen Abbau der Introns oder einen effektiven Schutz gespleißter Transkripte zu gewährleisten. Die Polyadenylierung und die geringe Akkumulation des freien linearen Introns der plastidären tRNA^{Val}(UAC) lassen eine effiziente Degradation vermuten (Vogel und Börner, 2002). Dagegen sind einige der freien *Lariat*-förmigen Introns in Chloroplasten gut nachweisbar, was ein ineffizientes *Debranching* vermuten lässt (z.B. Jenkins et al., 1997; Vogel und Börner, 2002). Auch eine regulative Funktion des Abbaus freier Introns durch die Freisetzung gebundener Spleißfaktoren wurde vorgeschlagen (del Campo und Casano, 2008).

1.2.3 Vorkommen und Aufbau von Maturasen

Maturasen wurden vorrangig in Mitochondrien von Pilzen und in Bakterien untersucht (zusammengefasst in Lambowitz et al., 1999). Es handelt sich um Proteine, die in einer funktionellen Adaptation aus *Retrohoming*-Enzymen hervorgingen (s. Kap. 1.2.4). Für einige der kodierenden Introns konnte die genetische Mobilität gezeigt werden, sie verhalten sich wie Retroelemente. Eine Unterstützung des Spleißens des Heimatintrons durch intronkodierte Proteine mildert somit die negativen Effekte des *Retrohomings* auf RNA-Ebene ab und kann damit das Potential der Ausbreitung verbessern.

Gruppe-I-Intron-Maturasen sind mit der LAGLIDADG-Familie der *Homing*-Endonukleasen verwandt und unterstützen entweder Intronmobilität (*Retrohoming*) und Spleißen oder sind spezialisierte Spleißfaktoren, die die Endonukleasefunktion verloren haben. In den Plastomen der Landpflanzen findet sich lediglich ein Gruppe-I-Intron (s. Kap. 1.1.3.3), das jedoch keine Maturase kodiert. Gleichwohl sind Gruppe-I-Introns aus *Chlamydomonas* bekannt, die für Maturase-Homologe mit *Retrohoming*- aber ohne Maturase-Aktivität kodieren (z.B. Dürrenberger und Rochaix, 1991). Vereinzelt wurden auch LAGLIDADG-Domänen-Proteine in Gruppe-II-Introns bzw. deren Spleißfaktoren gefunden (de Longevialle et al., 2008; Toor und Zimmerly, 2002).

Die üblichen Gruppe-II-Intron-Maturasen sind durch vier charakteristische Domänen

gekennzeichnet, eine DNA-Binde- (D), DNA-Endonuklease- (En) und Reverse-Transkriptase-Domäne (RT) sowie die Domäne X, wobei im Wesentlichen die drei erstgenannten den *Retrohoming*-Prozess realisieren und Domäne X und die RT-Domäne den Spleißprozess unterstützen (zusammengefasst in Lambowitz und Zimmerly, 2004). Die Sequenzen der Maturasen sind in einem Loop der DIV des Heimatintrons lokalisiert, der die katalytische Aktivität des Introns nicht beeinflusst. Maturasen werden entweder zusammen mit dem ersten Exon des sie beherbergenden Gens translatiert und proteolytisch von diesem getrennt oder sind freistehend (s. Abb. 4 und Kap. 1.2.8).

1.2.4 Maturasen und *Retrohoming*

Retrohoming konnte für einige Gruppe-II-Introns nachgewiesen werden (z.B. L1.LtrB aus *Lactococcus lactis*, Cousineau et al., 1998, *coxI-a11* und *coxI-a12* aus *Saccharomyces cerevisiae*, Yang et al., 1996). Die Mobilität des Introns wird dabei durch den Prozess der *targeted DNA-primed reverse transcription* (TPRT) mit Hilfe des intronkodierten Proteins erreicht (Übersicht in Lambowitz und Zimmerly, 2004). Beim TPRT erfolgt nach dem Spleißen die direkte Integration des freien Introns (RNA) in die Ziel-DNA durch reverses Spleißen. Entscheidend für die Erkennung der Insertionsstelle ist die Basenpaarung der EBS- bzw. δ -Sequenzen des Introns mit den IBS- bzw. δ' -Sequenzen der Ziel-DNA (s. Abb. 4). Die Integration über diese Basenpaarungen stellt die Spleißkompetenz am Insertionsort sicher und minimiert so die negativen Folgen für den „Wirt“. Beim *Retrohoming* des L1.LtrB-Introns wird dann der Gegenstrang der Ziel-DNA mittels En-Domäne, einer H-N-H-Endonukleasedomäne, geschnitten, wodurch ein *Primer* für die RT-Domäne erzeugt wird, die das Intron revers in cDNA transkribiert. Nach der Wiederherstellung der Integrität der Ziel-DNA durch Replikations- und Reparaturenzyme des „Wirts“ ist das Intron (DNA) integriert. Auch die Integration ohne Endonukleaseaktivität wurde gezeigt und nutzt naszierende DNA-Stränge (*leading* oder *lagging*) an Replikationsgabeln als *Primer*. Gruppe-II-Introns integrieren mit hoher Frequenz in spezifische DNA-Sequenzen (gewöhnlich intronlose Allele des sie beherbergenden Gens). Daneben erfolgt mit geringerer Frequenz die Integration in ektopische, der natürlichen *Homing*-Sequenz ähnliche DNA-Positionen. Das *Retrohoming* von Gruppe-II-Introns wird in Vektoren, sogenannten Targetrons, genutzt, um Sequenzen in spezifische DNA-Positionen zu integrieren (z.B. Guo et al., 2000).

1.2.5 Maturasefunktion beim Spleißen von Gruppe-II-Introns

Die Maturasefunktion intronkodierter Proteine ist mit der Domäne X assoziiert, die drei vorhergesagte α -Helices enthält und der *Thumb*-Domäne der RT entspricht (Blocker et al., 2005). Domäne X ist meist basisch, was eine RNA-Bindung unterstützt (Mohr et al., 1993). Für die Domäne X und den N-terminalen Teil der RT-Domäne der LtrA-Maturase (L1.LtrB-Intron, *Lactococcus lactis*) ist eine Unterstützung des Spleißprozesses gezeigt, wohingegen die DNA-Binde- und Endonukleasedomäne diesen nicht beeinflussen (Cui et al., 2004; San Filippo und Lambowitz, 2002). LtrA bindet *in vitro* als Homodimer spezifisch an sein Heimatintron, wobei die Dimerisierung in Gegenwart des Introns stattfindet (Blocker et al., 2005; Saldanha et al., 1999). Der erste Kontakt zwischen Intron und Protein beruht auf elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen basischem LtrA und negativ geladener RNA (Rambo und Doudna, 2004). Die Bildung des Ribonukleoproteins (RNP) führt dann zur Stabilisierung und Konformationsänderung der RNA- und Proteinkomponente, wobei das Intron in die spleißaktive Struktur wechselt (Rambo und Doudna, 2004). Die Bindung erfolgt primär durch den N-terminalen Teil der RT-Domäne an eine kleine Stammschleife in DIV (DIVa, s. Abb. 4, Matsuura et al., 2001; Wank et al., 1999). LtrA-Bindung und ein ineffizienter Spleißprozess finden aber auch statt, wenn DIVa deletiert ist (Matsuura et al., 2001). Auch für den Spleißprozess des Hefeintrons *coxI-aI2* ist die Bindung seines intronkodierten Proteins p62 an DIVa nicht essentiell (Huang et al., 2003). RT- und X-Domäne des LtrA-Proteins gehen sekundäre Kontakte mit anderen Intronodomänen ein (DI, DII, DVI), welche die Ausbildung des katalytischen Zentrums des Introns unterstützen (Matsuura et al., 2001). Nach dem Spleißprozess bleibt LtrA an das freie Intron gebunden, so dass der *Turnover* des RNP *in vivo* wahrscheinlich durch weitere Proteinaktivität unterstützt wird (z.B. durch *Debranching*-Enzyme, Saldanha et al., 1999).

1.2.6 MatK: Ein polyspezifischer Spleißfaktor?

Nahezu alle plastidären Spleißfaktoren sind kernkodiert (s. Kap. 1.1.3.3). Daneben befindet sich im Gruppe-IIA-Intron der tRNA^{Lys}(UUU) ein Gen mit Homologien zu Maturasen, die Maturase K (MatK, s. Abb. 4, Neuhaus und Link, 1987). Die *matK*-Sequenz findet sich auf dem Plastom aller grünen Landpflanzen. Dennoch handelt es sich um eine der am schnellsten evolvierenden Gen-Sequenzen der Plastiden, so dass

matK verbreitet als phylogenetischer Marker verwendet wird. Die MatK-Aminosäuresequenz ist im Vergleich zu der anderer Maturasen degeneriert (s. Abb. 4). Von den vier typischen Maturasedomänen (s. Kap. 1.2.3) sind in der Sequenz nur noch die Domäne X und die Sequenzblöcke 5 - 7 der RT-Domäne erhalten, wobei Sekundärstruktur-Alignments ebenso die Sequenzblöcke 0 und 3 der RT-Domäne erkennen lassen (Barthet und Hilu, 2007a; Mohr et al., 1993). Die Degeneration eines konservierten und funktionell essentiellen Aminosäuremotivs in der RT-Domäne 5 lässt vermuten, dass MatK keine RT-Funktion besitzt (YXDD zu z.B. YQGK in Tabak, Mohr et al., 1993). Trotz der Sequenzdegeneration wurde bald über eine Funktion der Maturase K als Spleißfaktor spekuliert (Mohr et al., 1993). Für eine Proteinfunktion sprachen die positive Selektion auf die Sequenz zumindest der Domäne X, die Existenz des Gens auf dem Plastom aller grünen Landpflanzen sowie Edierungsstellen die eine konservierte Aminosäure restituieren (z.B. Hao et al., 2009; McNeal et al., 2009; Vogel et al., 1997). Daneben wurde die RNA-Bindeaktivität des MatK-Proteins *in vitro* gezeigt (Liere und Link, 1995). Mittlerweile belegen immunologische Nachweise die Präsenz des Proteins (Barthet und Hilu, 2007b; du Jardin et al., 1994; Vogel et al., 1999).

Indirekte genetische und evolutionäre Hinweise sprechen dafür, dass MatK nicht nur sein Heimatintron, sondern weitere plastidäre Gruppe-II-Introns als Spleißfaktor bedient. In den *Albostrians*- und *Iojap*-Mutanten aus Gerste und Mais, die ein Defizit an intakten plastidären Ribosomen zeigen, konnten Spleißdefizienzen für das *matK*-Heimatintron und weitere Gruppe-IIA-Introns nachgewiesen werden. Dies legt die Beteiligung eines plastidär kodierten Spleißfaktors nahe, wobei MatK der beste Kandidat ist (Übersicht in Jenkins et al., 1997; Vogel et al., 1999). Trotz Nachweis des MatK-Knockouts in der *Albostrians*-Mutante, könnte die Spleißdefizienz durch den Ausfall anderer plastidär kodierter Proteine oder der Ribosomen selbst verursacht sein (Vogel et al., 1999). Versuche, transplastomische *matK*-Knockouts in Tabak zu erzeugen, führten, selbst wenn das *trnK*-Intron auf DNA-Ebene entfernt wurde, lediglich zu instabil heteroplastomischen Geweben (Drescher, 2003). Dies zeigt, dass *matK* essentiell in der Entwicklung von Tabak ist und wahrscheinlich weitere Introns neben dem Heimatintron bedient. Daneben scheint die Mutation von *matK* in den *vireszenten Wogon*-Sugi-Mutanten aus *Cryptomeria japonica* Chlorophylldefizienz zu verursachen, was die Bedeutung von *matK* bei der Chloroplastenbiogenese unterstreicht (Hirao et al., 2009).

Aus evolutionärem Blickwinkel erlauben einige parasitische Pflanzen, ursprüngliche Farne und eine Alge interessante Aufschlüsse über Funktion und potentielle Ziel-Introns eines Spleißfaktors MatK (zusammengefasst in Krause, 2008; McNeal et al., 2009). In den Plastomen der parasitierenden Pflanzen *Epifagus virginiana*, *Cuscuta exaltata* und *Cuscuta reflexa* sowie der Alge *Zygnema circumcarinatum* und des Farns *Adiantum capillus-veneris* finden sich freistehende *matK*-Sequenzen und kein *trnK*-Gen, was eine Funktion *in trans* vermuten lässt, da in allen Arten Gruppe-IIA-Introns erhalten sind. Demgegenüber fehlt allen parasitären *Cuscuta*-Arten der Untergattung *Grammica* das *matK*-Gen auf dem Plastom. Interessanterweise sind in allen fünf Arten neben *matK* auch die Gruppe-IIA-Introns bzw. die intronhaltigen Gene bis auf das zweite Intron in *clpP* verloren gegangen. Dieses *clpP*-Intron ist strukturell ein Außenseiter unter den Gruppe-IIA-Introns und evolutionär jünger als *matK* und die restlichen Gruppe-IIA-Introns (Michel et al., 1989; Turmel et al., 2005). Der parallele Verlust von Gruppe-IIA-Introns und *matK* lässt die Abhängigkeit dieser Introns von einem MatK-Spleißfaktor vermuten, wenngleich ein *matK*-Transfer ins Kerngenom nicht ausgeschlossen ist.

MatK wäre damit ein Beispiel für eine Gruppe-II-Intron-Maturase, die die exklusive Spezifität zum Heimatintron aufgegeben hat und mehrere Introns bedient. Betrachtet man Gruppe-II-Introns als Vorläufer der spleißosomalen Introns, so kann MatK ein interessantes Modell für frühe nukleäre Spleißfaktoren darstellen, die nach der Expansion der Gruppe-II-Introns und vor der Akquisition von Wirts-Proteinen beim Übergang zum Spleißosom wirkten (s. Kap. 1.2.8). Ein direkter Beweis für die Interaktion zwischen MatK und seinen putativen Ziel-Introns fehlt allerdings.

1.2.7 Potentielle Gründe der *matK*-Konservierung auf dem Plastom

Eine interessante evolutionäre Fragestellung ist, warum *matK* auf dem Plastom verblieben ist und nicht, wie zahlreiche Gene des ehemaligen Endosymbionten, während der Plastidenevolution in den Kern transferiert wurde. Als allgemeine Ursache für den Erhalt plastidärer Gene wurden membranbedingte Transporthemmnisse, die Toxizität im Zytoplasma, die Notwendigkeit der kotranslationellen Assemblierung, regulative Erfordernisse und diverse andere Gründe vorgeschlagen (Übersicht z.B. in Allen, 2003; Barbrook et al., 2006). In der Kernsequenz von *Arabidopsis* und Reis sind in der Tat vier freistehende Maturasegene gefunden worden, für deren Proteine eine mitochon-

driale Lokalisation vorhergesagt und z.T. gezeigt ist (nMat-1a, -1b, -2a, -2b; Keren et al., 2009; Mohr und Lambowitz, 2003). Für nMat-1a und -b, zwei Proteine mit kompletter RT-Domäne und Domäne X, aber ohne DNA-Binde- und Endonukleasedomäne, ist die Beteiligung am Spleißen mitochondrialer Gruppe-II-Introns gezeigt (Keren et al., 2009; Nakagawa und Sakurai, 2006). Damit ist der posttranslationelle Import kernkodierter Maturasen zumindest für mitochondriale Vertreter möglich. Eine andere denkbare Ursache für den Verbleib von *matK* auf dem Plastom könnte ein Autoregulationsmechanismus sein, der die effiziente Kontrolle der Expression erlaubt (s. Kap. 1.2.8), aber bei kernkodierten Spleißfaktoren durch die räumliche Trennung von Transkription (Kern), Translation (Zytoplasma) und Spleißen (Chloroplast) kaum umsetzbar ist. Eine weitere Möglichkeit bestünde in einer regulativen Funktion des Spleißens für die Genexpression. Immerhin sind sechs der sieben potentiellen Ziel-Introns von MatK in tRNAs oder Genen ribosomaler Proteine lokalisiert. Folglich könnte MatK als Stellglied der plastidären Genexpression dienen, dessen präzise Regulation in Anpassung an die Bedürfnisse des einzelnen Chloroplasten essentiell wäre, so dass eine Kodierung auf dem Plastom erforderlich ist.

1.2.8 Regulation der Expression von Gruppe-II-Intron-Maturasen

Von den gut untersuchten Maturasen LtrA und p62 (L1.LtrB-Intron, *Lactococcus lactis* und *coxI-aI2*-Intron, *Saccharomyces cerevisia*) sind zwei interessante, negativ rückgekoppelte Regulationsmechanismen der Expression bekannt.

Das intronkodierte LtrA bindet mit hoher Affinität an eine Subdomäne der Domäne IV, die das Startkodon und die Ribosomenbindestelle für die *LtrA*-Translation enthält (DIVa, Singh et al., 2002). Die Bindung von LtrA in dieser Subdomäne realisiert neben dem Spleißen und *Retrohoming* auch die Funktion der Translationsregulation, indem die Translationsinitiation durch Maskierung der Ribosomenbindestelle inhibiert wird (Singh et al., 2002). Hinzu kommt, dass LtrA ohne gebundenes Intron instabil ist und eine ausgeprägte *cis*-Präferenz zu RNA hat, von der es translatiert wurde, was diese Art der Regulation noch effizienter gestaltet (Cui et al., 2004). Dieser Autoregulationsmechanismus sorgt dafür, dass adäquate Mengen des Spleißfaktors produziert werden. Daneben kann die LtrA-Bindung den Eintritt des Ribosoms in das Intron und damit die Zerstörung der spleißaktiven Intronstruktur verhindern (Singh et al., 2002). Inwieweit

ein solcher Regulationsmechanismus auch bei der MatK-Expression realisiert wird, ist nicht untersucht, wenngleich Autoregulation bei der Expression plastidärer Gene anzutreffen ist (s. Kap. 1.1.4). Die N-terminale Extension organellärer Maturasen könnte eine evolutionäre Adaptation darstellen, die die effizientere Translationsinitiation oder -regulation erlaubt (Lambowitz und Belfort, 1993). Eine von *trnK* unabhängige Transkription von *matK* wurde vorgeschlagen, ist aber nicht belegt, so dass auch die Translation vom ungespleißten *trnK*-Vorläufer bzw. dem freien Intron denkbar ist (Barthet und Hilu, 2007b).

Ein anderer Mechanismus negativer Rückkopplung zeigt sich für die intronkodierte Proteine der Hefeintrons *coxI*-a11 und -2 (zusammengefasst in Lambowitz und Zimmerly, 2004). Diese Proteine werden mit dem 5'-Exon des sie beherbergenden Gens kotranslatiert, posttranslational proteolytisch freigesetzt und damit aktiviert. Nach dem, durch die aktivierte Maturase assistierten, Spleißen der intronhaltigen Vorläufer-RNA ist ihre weitere Translation unterbunden. Diese Autoregulationsmechanismen können den negativen Einfluss des genetisch mobilen Elements auf den „Wirt“ abmildern.

1.2.9 Evolution von Gruppe-II-Introns und Maturasen

Gruppe-II-Introns wurden in Bakterien und pflanzlichen Organellen gefunden, in Archaeen sind sie die Ausnahme, in den Kernen der Eukaryoten sowie den Mitochondrien der Metazoen fehlen sie (Übersicht in Lambowitz und Zimmerly, 2004). Ihre Verteilung lässt auf die primäre Evolution in Bakterien und eine spätere Invasion in Eukaryoten, vermutlich durch Endosymbiose, schließen. In den Kernen der Eukaryoten haben sich die spleißosomalen Introns durchgesetzt, mutmaßliche Abkömmlinge der Gruppe-II-Introns. In den Mitochondrien der Metazoen kam es vermutlich zum Verlust der Gruppe-II-Introns. Eine Expansion von Gruppe-II-Introns könnte zur Kernbildung geführt haben, um die Kompartimentierung zwischen langsamem Spleißprozess und schneller Translation herbeizuführen (Martin und Koonin, 2006).

Phylogenetische Analysen lassen die Einteilung der in Gruppe-II-Introns kodierten Proteine in acht Klassen zu (mitochondriale, chloroplastenähnliche 1 bzw. 2, bakterielle A - E, Übersicht in Lambowitz und Zimmerly, 2004). Jeder Klasse dieser Proteine lässt sich eine strukturelle Unterklasse der Gruppe-II-Introns zuordnen, was die Koevolution von Intron und intronkodiertem Protein zeigt und eine ursprüngliche Assoziation beider

wahrscheinlich macht. Diese sogenannte „Retroelement-Vorläufer-Hypothese“ geht vom sekundären Verlust intronkodierter Proteine in Organellen und einigen Bakterien aus, was durch Reste kodierender Sequenzen in nichtkodierenden Introns untermauert wird (z.B. Toor et al., 2001). MatK und LtrA gehören zur mitochondrialen Klasse der Maturasen, die in Gruppe-IIA1-Introns kodiert sind (Hausner et al., 2006). Der evolutionäre Ursprung mobiler Gruppe-II-Introns könnte in einem Retroelement liegen, das Spleißaktivität entwickelte oder in der Invasion einer RT bzw. eines Retroelements in ein existierendes Gruppe-II-Ribozym (Überblick in Lambowitz und Zimmerly, 2004). Gruppe-II-Introns stehen unter dem selektiven Druck, die Spleißaktivität zu erhalten und die Mobilität zu minimieren, um die negativen Effekte auf den „Wirt“ zu reduzieren. Der Ersatz intronkodierter durch Wirtsproteine als Spleißfaktoren erfüllt diese Forderungen, was die Komplementation intronkodierter Proteine durch kernkodierte Spleißfaktoren in pflanzlichen Organellen erklären kann (Lambowitz und Zimmerly, 2004). Außerdem sind die Ausbreitungsmöglichkeiten in den kleinen, in ihrer Population isolierten, Organellengenomen begrenzt, was zu einer Sättigung der Zielsequenzen und dem Verlust der intronkodierten Proteine geführt haben könnte.

Gruppe-II-Introns werden als Vorläufer der spleißosomalen Introns vermutet und die RNP-Komplexe ihrer intronkodierten Proteine zeigen Verwandtschaft mit Non-LTR-Retrotransposons (*long terminal repeats*) und Telomerasekomplexen (zusammengefasst in Eickbush, 1997; Lambowitz und Zimmerly, 2004). Die mutmaßlichen Schlüsselschritte bei der Konversion von Gruppe-II-Introns in spleißosomale Introns wie Degeneration der RNA-Struktur, Abhängigkeit von allgemeinen Spleißfaktoren und Nutzung von *in trans* agierender RNA, können in den Gruppe-II-Introns rezenter Arten nachvollzogen werden (s. Kap. 1.1.3.3 und Kap. 1.2.2). Hinzu kommt die strukturelle Ähnlichkeit der RNA-Fragmente des Spleißosoms mit Gruppe-II-Introns (z.B. U2-U6-snRNA-Paarung entspricht DV) und die Nutzung des gleichen molekularen Spleißmechanismus mit der Ausbildung der 2'-5'-Phosphodiesterbindung eines *bulged A* (Cech, 1986; Michel und Ferat, 1995). Somit kann ein Erkenntnisgewinn der Funktion von Gruppe-II-Introns und ihrer intronkodierten Proteine auch zu einem besseren funktionellen Verständnis anderer RNP-Partikel beitragen, in denen ebenfalls die Koevolution von RNA- und Proteinkomponenten zur Ausprägung der Funktion beigetragen hat.

1.3 PPR-Proteine und P67

Proteine mit Pentatricopeptid-Repeat-Domänen (PPR) wurden vor zehn Jahren als große Familie in Pflanzen beschrieben (Aubourg et al., 2000; Small und Peeters, 2000). Für die meisten ihrer Vertreter ist eine Lokalisation in den pflanzlichen Organellen vorhergesagt oder gezeigt (Lurin et al., 2004; Schmitz-Linneweber und Small, 2008). Die charakterisierten PPR-Proteine zeigen eine essentielle und omnipräsente Beteiligung im RNA-Metabolismus der Mitochondrien und Chloroplasten (zusammengefasst in Delannoy et al., 2007; Saha et al., 2007; Schmitz-Linneweber und Small, 2008).

1.3.1 Eine Familie, viele Funktionen

PPR-Proteine sind an den posttranskriptionellen Prozessen pflanzlicher Organellen wie Spleißen, Edieren, RNA-Prozessierung, aber auch an Transkription und Translation beteiligt (s. Abb. 5 und Kap. 1.1). Das charakteristische Repetitionsmotiv aus 35 Aminosäuren tritt in 2 - 30 Wiederholungen auf, die pro PPR-Motiv aus zwei vorhergesagten gegenläufigen α -Helices bestehen (Small und Peeters, 2000). Damit gehören die PPR-Proteine, wie die verwandten TPR-Proteine (Tetratricopeptid *repeat*) und die Puf-Domänen-Proteine (*Pumilio-family RNA binding repeat*) zur α -Solenoid-Proteinsuperfamilie (Schmitz-Linneweber und Small, 2008). Vermutlich bilden die Tandem-PPR-Motive mit Hilfe konservierter Tyrosinreste, ähnlich den TPR-Motiven, eine Superhelix mit innenliegender Binefurche (Delannoy et al., 2007). Im Unterschied zu TPR-Proteinen, die Proteine binden, wird die vorhergesagte konkave Binefurche der PPR-Proteine im Zentrum fast ausschließlich von hydrophilen und am Grund von positiv geladenen Aminosäuren dominiert, was den RNA-bindenden Puf-Domänen-Proteinen ähnelt und hydrophile, saure Liganden, wie RNA vermuten lässt (Delannoy et al., 2007). Es ist denkbar, dass die Bindung einer RNA-Base an je einen PPR-Repeat erfolgt. Mittlerweile ist die Kapazität der RNA-Bindung/-Assoziation von PPR-Proteinen vielfach *in vivo* und *in vitro* belegt, wenngleich die molekularen Grundlagen der Interaktion und Spezifität weitestgehend unbekannt sind (Schmitz-Linneweber und Small, 2008).

PPR-Proteine lassen sich aufgrund ihrer Domänenstruktur in zwei Klassen einteilen, die P-Klasse, die ausschließlich kanonische, 35 Aminosäuren umfassende, PPR-Domänen (P) enthält und die PLS-Klasse (auch *plant combinatorial and modular proteins*, PCMP), die charakteristische Triplets aus regulären P- sowie längeren L- und kürzeren

S-Motiven enthält (*long* bzw. *short*, im Allgemeinen 36 bzw. 31 Aminosäuren lang, Übersicht in Schmitz-Linneweber und Small, 2008). Daneben weisen die Vertreter der PLS-Familie meist C-terminale Extensionen auf, die eine weitere Unterteilung dieser Klasse zulassen. Es sind die E- und E⁺-Domänen (*extended*), mittlerweile zur E-Domäne vereint, sowie die diesen z.T. nachgeschaltete DYW-Domäne beschrieben (Lurin et al., 2004), so dass sich eine E- und eine DYW-Familie sowie die PLS-Familie der PLS-Klasse ergibt (Schmitz-Linneweber und Small, 2008). Die C-terminalen Domänen könnten der Interaktion mit anderen Proteinen dienen, während die PPR-Domänen RNA binden (Delannoy et al., 2007). Daneben sind wenige PPR-Proteine mit C-terminaler SMR- oder RRM-Domäne beschrieben (s. Kap. 1.3.2 und Kap. 1.1.3.3).

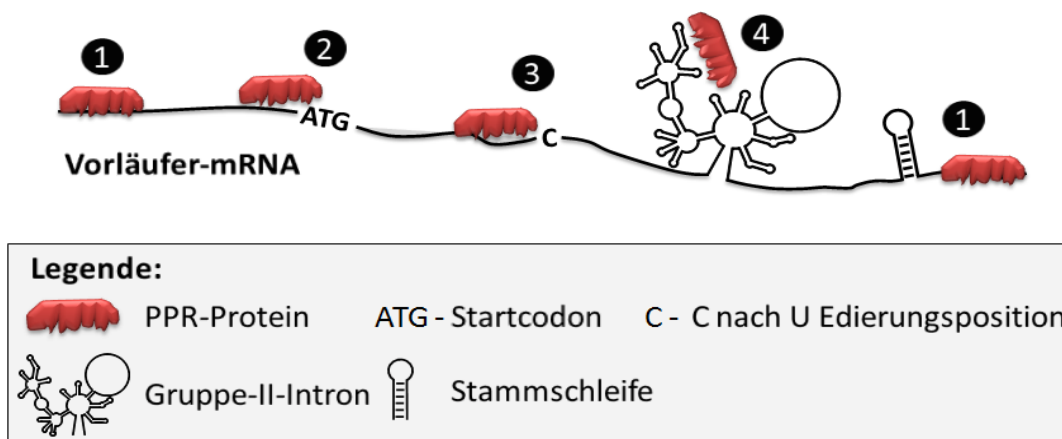


Abb. 5: Zusammenfassung bekannter Funktionen plastidär lokalisierter PPR-Proteine. Eine Vorläufer-mRNA mit Startcodon, Edierungsstelle, Gruppe-II-Intron und Stammschleife in der 3'-UTR ist schematisch als schwarze Linie dargestellt. Gezeigt ist die Beteiligung von PPR-Proteinen an der Transkriptstabilität am 5'- und 3'-Ende (1, in der 3'-UTR in Kooperation mit Stammschleifen), der Translation (2), der Edierung (3) und dem Spleißen (4). Details im Text.

Den meisten PPR-Proteinen fehlen katalytische Domänen. PPR-Proteine stellen wahrscheinlich keine Effektoren sondern Spezifitätsfaktoren dar und vermitteln oder verhindern den sequenzspezifischen Kontakt anderer Proteine zum RNA-Substrat (Schmitz-Linneweber und Small, 2008). In der Tat wurden PPR-Proteine in Proteinkomplexen gefunden (s. Kap. 1.1.3.3), wenngleich der direkte Kontakt zu anderen Proteinen in Pflanzen bisher noch nicht gezeigt wurde (Delannoy et al., 2007). Für die DYW-Domäne wurde eine Edierungsaktivität vorgeschlagen, obgleich eine aktuelle Publikation die endonukleolytische Funktion der Domäne zeigt (Nakamura und Sugita, 2008; Schmitz-Linneweber und Small, 2008).

Mutationen in PPR-Proteinen führen zu einem weiten Spektrum an Phänotypen, von Defekten der Samenreifung und Photosynthese über zytoplasmatische männliche Sterilität (CMS) bis hin zu Embryoletalität, was ihre spezifischen Funktionen widerspiegelt (Übersicht in Schmitz-Linneweber und Small, 2008). Interessant ist der Vergleich zwischen Knockouts in Mais und *Arabidopsis*. Während z.B. für PPR4 und -5 der Knockout in *Arabidopsis* embryoletal ist, keimen Maispflanzen in denen die orthologen Gene mutiert sind und sterben früh in ihrer Entwicklung (Beick et al., 2008; Schmitz-Linneweber et al., 2006). Verantwortlich dafür ist vielleicht die allgemeine Blockade der plastidären Translation in diesen Mutanten und damit der Knockout essentieller Gene der Entwicklung, die in Monokotyledonen nicht auf dem Plastom kodiert sind (*ycfl/-2*, *accD*, Schmitz-Linneweber und Small, 2008).

Ihre Omnipräsenz in den posttranskriptionellen Prozessen der Plastiden macht PPR-Proteine zu idealen Kandidaten der Regulation plastidärer Genexpression. Bisher gibt es dafür aber kaum belastbare Beweise. MCA1, ein PPR-Protein aus *Chlamydomonas*, reguliert nährstoffabhängig die Transkriptstabilität von *petA* (Loiselay et al., 2008; Raynaud et al., 2007). Der Nachweis regulativer Einflüsse der PPR-Proteine in Landpflanzen fehlt bislang. Dagegen spricht auch die konstitutive und schwache Expression vieler PPR-Gene zumindest auf RNA-Ebene (Lurin et al., 2004). Dennoch sind auch Beispiele für differentielle Genexpression bekannt (Saha et al., 2007).

Die evolutionäre Herkunft der PPR-Proteine ist unklar. Ein Charakteristikum der Proteinfamilie ist jedoch die enorme Expansion in den Genomen der Landpflanzen, die vermutlich durch Retrotransposition verursacht wurde (O'Toole et al., 2008). Als Ursache der parallelen Ausbreitung von PPR-Proteinen und Landpflanzen wurde spekuliert, dass PPR-Proteine Mutationen des Plastoms, die durch oxygenen und UV-Stress nach dem „Landgang“ verursacht wurden, auf RNA-Ebene kompensierten (z.B. als Edierungsfaktoren, Maier et al., 2008). Die Genome pflanzlicher Organellen evolvieren weitaus langsamer als das des Kerns, so dass „Kernreparaturfaktoren“ die Defizienzen der Organellen ausgleichen könnten (Maier et al., 2008). Einmal etabliert, wurden diese Mechanismen erhalten und möglicherweise für die Regulation der Genexpression genutzt. Die PPR-Familien aus Reis und *Arabidopsis* zeigen im Vergleich zu anderen Proteinfamilien erstaunliche Ähnlichkeit. Für mehr als 80 % der PPR-Proteine finden sich Orthologe in beiden Spezies (O'Toole et al., 2008). Diese

niedrige Rate der Genverluste bzw. -duplikationen spricht für einen starken Selektionsdruck, eine geringe funktionelle Redundanz und eine ausgeprägte Konservierung der Funktionen der PPR-Proteine in Angiospermen (O'Toole et al., 2008).

1.3.2 P67: Ein PPR-Protein mit SMR-Domäne

In *Arabidopsis* sind neun P-Klasse-PPR-Proteine mit C-terminaler SMR-Domäne kodiert (*small MutS-related*), von denen drei detaillierter charakterisiert sind (GUN1, Koussevitzky et al., 2007; P67, Lahmy et al., 2000; pTAC2, Pfalz et al., 2006).

Die SMR-Domäne weist Homologien zu DNase I auf und wurde als hochkonservierte C-terminale Domäne von MutS2-Proteinen, einer Gruppe von MutS1-Homologen, beschrieben (Diercks et al., 2008; Moreira und Philippe, 1999). Das MutS1-Protein der Prokaryoten erkennt fehlgepaarte Basen nach der Replikation und während der Rekombination und leitet zusammen mit dem MutL- und MutH-Protein, einer *Nicking*-Endonuklease, die *Mismatch*-Reparatur ein (zusammengefasst in Iyer et al., 2006). MutS2-Proteine besitzen mit der SMR-Domäne eine eigene *Nicking*-Endonuklease-Aktivität, die zu einem MutL/-H unabhängigen Weg der *Mismatch*-Reparatur beitragen oder beim *Crossover* der Meiose beteiligt sein könnte (Fukui et al., 2007; Malik und Henikoff, 2000). Für das MutS2-Protein aus *Helicobacter pylori* wurde gezeigt, dass es nicht an der *Mismatch*-Reparatur beteiligt ist, sondern Rekombinationsereignisse unterdrückt, wobei die SMR-Domäne endonukleolytisch Rekombinationsstrukturen auflösen könnte (Kang et al., 2005; Pinto et al., 2005). Ob die SMR-Domänen von PPR-Proteinen ähnliche Funktionen ausüben, ist unbekannt. Lediglich für eines der PPR-SMR-Proteine (GUN1) ist die unspezifische DNA-Bindung gezeigt (Koussevitzky et al., 2007).

GUN1 spielt eine Rolle im retrograden *Signalling* der Chloroplasten (Koussevitzky et al., 2007). Die Zusammensetzung plastidärer Proteinkomplexe aus kern- und plastidenkodierten Untereinheiten erfordert die koordinierte Expression und damit anterograde bzw. retrograde Signalwege, die vom Kern zum Chloroplasten bzw. entgegengesetzt orientiert sind (Übersicht in Kleine et al., 2009; Woodson und Chory, 2008). Mutanten mit gestörtem retrogradem *Signalling* zeigen den *Genomes-Uncoupled*-Phänotyp (GUN), bei dem die Expression nukleär kodierter Gene der Photosynthese vom physiologischen Zustand der Chloroplasten entkoppelt ist (z.B. *Lhcb1*, *RbcS*). Retrograde Signalwege perzipieren den Status der plastidären Genexpression sowie den Redoxstatus der photo-

synthetischen Elektronentransportkette und/oder die Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies. GUN1 ist in retrograde Signalwege involviert und ein Kandidat für einen plastidären Faktor der Generierung, Perzeption oder Transmission eines zentralen Signals zum Kern (Koussevitzky et al., 2007). GUN1 und pTAC2 sind nah verwandte PPR-SMR-Proteine und kolokalisieren suborganellär, was eine Rolle in der Regulation der plastidären Transkription nahelegt (Koussevitzky et al., 2007; Pogson et al., 2008). Der molekulare Wirkmechanismus des GUN1-Proteins ist unklar.

pTAC2 (*plastid transcriptionally active chromosome*), ein weiteres der drei charakterisierten PPR-SMR-Proteine, wurde bei der Analyse des plastidären transkriptionsaktiven Komplexes in *Arabidopsis* und Senf identifiziert (Pfalz et al., 2006). Der Knockout des entsprechenden Gens in *Arabidopsis* ist embryolethal, kann aber durch Kultivierung auf Saccharose-haltigem Medium gerettet werden, wobei die Pflanzen reduzierte Chlorophyllgehalte und eine abnorme Chloroplastenstruktur aufweisen. Die pTAC2-Mutanten zeigen ein Expressionsmuster plastidärer RNAs, das mit dem von Knockouts der plastidär kodierten RNA-Polymerase (PEP) korreliert, was für eine Beteiligung in der PEP-abhängigen Transkription spricht. *pTAC2* wird gewebespezifisch exprimiert, wobei hohe RNA-Levels in Blättern und Blüte und geringe RNA-Levels in der Wurzel auftreten. Die molekulare Funktion dieses PPR-Proteins ist unbekannt.

P67, das dritte bisher untersuchte PPR-SMR-Protein, wurde vor 15 Jahren als Kern-rRNA-Vorläufer bindendes Protein aus Rettich-Zellextrakten isoliert (Echeverria und Lahmy, 1995). Es wurde zunächst als Teil des nukleären rRNA-Prozessierungskomplexes vermutet (Echeverria und Lahmy, 1995). Später zeigten Immunolokalisations-Experimente und Fusionen mit Fluoreszenzproteinen die chloroplastidäre Lokalisation (Lahmy et al., 2000; Lurin et al., 2004). Die RNA-Bindeaktivität von P67 ist *in vitro* gezeigt (Echeverria und Lahmy, 1995). Eine gewebespezifische Expression der *P67*-mRNA in Blättern und Blüten wird durch RT-Versuche nahegelegt (Lahmy et al., 2000). Molekulare Funktionen von P67 sind nicht bekannt.

Die Analysen der drei charakterisierten PPR-SMR-Proteine zeigen, dass bisher insbesondere die molekularen Funktionen dieser kleinen Gruppe von PPR-Proteinen in den Chloroplasten unverstanden sind. So könnte es sich bei PPR-SMR-Proteinen, abweichend von der Mehrheit der analysierten PPR-Proteine, um katalytische Proteine handeln, deren SMR-Domäne möglicherweise nukleolytisch an Nukleinsäuren wirkt.

1.4 Zielstellung

Die für die Dynamik der plastidären Genexpression essentiellen posttranskriptionellen Prozesse werden fast ausschließlich von nukleär kodierten Faktoren realisiert. P67, ein Mitglied der im organellären RNA-Metabolismus prominenten PPR-Proteinfamilie, und MatK, eine putative Maturase, sind potentielle Akteure des plastidären Nukleinsäuremetabolismus, ersteres in der großen Fraktion kernkodierter Faktoren, letztere als einziger Kandidat für einen plastidär kodierten Spleißfaktor. In beiden Fällen geben Vorarbeiten einen ersten Einblick in mögliche Funktionen. Während es sich bei MatK um einen putativen Spleißfaktor diverser Gruppe-II-Introns handelt, liegt die molekulare Funktion von P67 möglicherweise in der Bindung und/oder Nukleolyse von Nukleinsäuren.

Ein Anliegen der vorliegenden Arbeit ist es, die Ziel-Introns des vermeintlichen Spleißfaktors MatK *in vivo* zu identifizieren und damit zu zeigen, dass MatK als Modell für die Konversion einer Maturase vom mono- zum polyspezifischen Spleißfaktor zu Beginn der Evolution von Gruppe-II-Introns zu spleißosomalen Introns dienen kann. Mit der RIP-Chip-Technik (RNA-Immunopräzipitation und Chip-Hybridisierung) steht dafür eine geeignete Methode zur Analyse von Protein-RNA-Assoziationen zur Verfügung. Diese wird hier erstmals mit einem transplastomischen Ansatz kombiniert, in dem MatK mit dem HA-Epitop markiert wird, das die Applikation hochreiner monoklonaler Antikörper ermöglicht. Dies eröffnet auch die Möglichkeit der Einengung der Bindestelle(n) und der Untersuchung von Proteininteraktionen im Spleißkomplex. Da *matK* für die Chloroplastenbiogenese essentiell und damit ein Knockout ausgeschlossen ist, könnte die Analyse transplastomischer, hypomorpher Punktmutanten des Gens bei der Aufklärung der Funktion helfen. Desweiteren können Untersuchungen zur Expressionsregulation von *matK* (und seiner Ziele) Aufschluss über die Ursache der Konservierung auf dem Plastom und die mögliche Funktion als ein Stellglied der plastidären Genexpression geben.

Seine Zugehörigkeit zur kleinen Gruppe der PPR-SMR-Proteine und die Verwandtschaft zu GUN1, einem essentiellen Bestandteil retrograder Signalwege, machen P67 zu einem interessanten Untersuchungsobjekt. Sowohl genetische als auch immunologische Analysen können zur Aufklärung der molekularen Funktion dieses Proteins beitragen. Möglicherweise erlaubt dies allgemeine Rückschlüsse auf die Rolle der PPR-SMR-Proteine in der plastidären Genexpression.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Pflanzenmaterial

Für die Plastidentransformation wurde *Nicotiana tabacum* cv. Petit Havana verwendet. SAIL-Transfer-DNA-Insertionslinien wurden vom Nottingham *Arabidopsis* Stock Center (NASC), CSHL-Transposon-Linien vom Cold Spring Harbor Laboratory bezogen (s. Tab. 1). *Zea mays* Mu-Insertionslinien (Sorten B73, A188, A163) wurden durch Prof. Dr. Alice Barkan zur Verfügung gestellt (s. Tab. 1). Als wildtypische Kontrolle wurde Saatmais der Sorten Tassilo (Camena) bzw. B73 verwendet.

2.1.2 Bakterienstämme

Rekombinante Plasmide wurden in *E. coli* TOP10 (Invitrogen) propagiert. Die heterologe Expression von Proteinen/Peptiden erfolgte in *E. coli* BL21(DE3) (Novagen).

2.1.3 Antikörper, Vektoren und Oligonukleotide

Eine Auflistung der verwendeten Antikörper, Vektoren und Oligonukleotide findet sich im Anhang (s. Tab. 2, Tab. 3, Tab. 4, ab S. 120).

2.1.4 Medien

2.1.4.1 Pflanzenmedien

MS-Medium:	4,24 % (w/v) Murashige und Skoog Basal Medium inkl. Saccharose und Agar (Sigma) bzw. 0,44 % (w/v) Murashige & Skoog Medium (Duchefa), 0,05 % (w/v) MES, 0,5 % (w/v) Pflanzenagar (Duchefa), 3 % (w/v) Saccharose; pH 5,8 mit KOH; modifiziert nach Murashige und Skoog (1962)
MS-Medium mit NF:	MS-Medium (s.o.) inkl. Norflurazon (5 μ M, Sigma); modifiziert nach Koussevitzky et al. (2007)
MS-Medium mit Spec.:	MS-Medium (s.o.) inkl. Spectinomycin-Dihydrochlorid-Pentahydrat (500 μ g/ml, Duchefa)

RMOP-Medium: MS-Medium mit Spec. (s.o.) inkl. 6-Benzylaminopurin (1 mg/l) und 1-Naphthylelessigsäure (0,1 mg/l) von Sigma; modifiziert nach Svab et al. (1990)

2.1.4.2 Bakterienmedien

LB-Medium: *Lysogeny-Broth*-Medium: 1 % (w/v) Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 1 % (w/v) NaCl, pH 7,0 mit NaOH; modifiziert nach Bertani (1951)

LB-Medium mit Agar: LB-Medium (s.o.) mit 1,5 % (w/v) Agar bzw. 3,5 % (w/v) LB-Agar (Sigma)

SOB-Medium *Super-Optimal-Broth*-Medium: 2 % (w/v) Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM Magnesiumsulfat, pH 7,0 mit NaOH; 10 mM MgCl₂ (Zugabe nach dem Sterilisieren im Autoklav aus einer steril filtrierte Stammlösung); nach Hanahan (1983)

SOC-Medium SOB-Medium (s.o.) inkl. 20 mM Glucose (Zugabe aus einer steril filtrierte Stammlösung); nach Hanahan (1983)

2.1.5 Standardpuffer und -lösungen

5x Transferpuffer: 1 M Glycin, 125 mM Tris-Base

10x MEN: 200 mM MOPS, 10 mM EDTA (pH 8,0), 80 mM NaAc, pH 7,0 bzw. pH 8,0 mit NaOH

10x SDS Laufpuffer: 1,92 M Glycin, 250 mM Tris-Base, 1 % (w/v) SDS

10x TBST: 0,5 M Tris-HCl (pH 7,5), 1,5 M NaCl, 1 Vol.% Tween 20

20x SSC: 3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat, pH 7,0 mit HCl

50x TAE 2 M Tris-Acetat (pH 8,0), 50 mM EDTA (pH 8,0)

2.1.6 Software

Eine Auflistung der verwendeten Software findet sich im Anhang (Tab. 5, S. 127).

2.1.7 Sonstige Materialien

Soweit nicht gesondert vermerkt, handelt es sich bei allen Puffern um wässrige Lösungen (Verwendung von *A. bidest*: deionisiertes, destilliertes Wasser, PURE-Lab-Ultra-Anlage, Veolia). Chemikalien und Biochemikalien wurden, sofern nicht gesondert vermerkt, von Roth, Merck, Serva oder Sigma, Radiochemikalien von PerkinElmer, Enzyme von Fermentas, NEB und Qiagen, Desoxy- und Ribonukleosidtriphosphate von Fermentas bezogen. Oligonukleotide wurden durch Sigma oder Eurofins MWG Operon synthetisiert. Zentrifugationen erfolgten, sofern nicht gesondert vermerkt, in Tischzentrifugen (BIOFUGE® FRESCO, Heraeus).

Alle anderen Materialien werden in den folgenden Kapiteln im Einzelnen beschrieben.

2.1.8 Anbieter

Eine Liste der Anbieter findet sich im Anhang (Tab. 6, S. 128).

2.2 Methoden

2.2.1 Pflanzenanzucht

Arabidopsis thaliana wurde auf einem Gemisch aus Erde (Einheitserde Typ T, frux®) und Vermiculite (4 : 1, 3 - 6 mm, DVD) bzw. Quarzsand (5 : 1, 0,1 - 0,5 mm, SAKRET) oder MS-Medium unter Langtagbedingungen (16 h Weißlicht/8 h Dunkelheit) bei 23 °C kultiviert. Die Lichtintensität betrug ca. $130 \mu\text{mol} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$.

Tabak wurde auf Erde (s.o.) oder MS-Medium unter Langtagbedingungen (s.o.) bei 27 °C kultiviert. Eine Düngung der Erde erfolgte mit Osmocote Pro 5-6M von Scotts (ca. 4 g Dünger/1 l Erde). Die Lichtintensität betrug je nach Wuchshöhe ca. $200 - 350 \mu\text{mol} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$. Die Kultivierung der Regenerate aus Plastidentransformationen erfolgte auf RMOP-Medium. Für die Isolation von Chloroplasten und jungem Material wurde Tabak auf einem Polyamidnetz (Maschenweite 500 μM , Franz Eckert GmbH) ausgesät und für 7 d auf wassergesättigtem Vermiculite kultiviert (Düngung s.o.).

Mais wurde auf einem Erde-Vermiculite-Gemisch (s.o.) unter Langtagbedingungen bei 27 °C kultiviert (s.o.). Die Lichtintensität betrug ca. $200 \mu\text{mol} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$. Für Kreuzungen und zur Samengewinnung wurde Mais im Freiland kultiviert. Die Ernte für RNA-, DNA- und Proteinisolationen erfolgte 7 - 13 d nach der Aussaat (2 - 3-Blatt-

Stadium). Für die Isolation von Chloroplasten wurden Maispflanzen nach der Keimung für 3 - 4 d etioliert (27 °C) und nach einem Tag unter Langtagbedingungen (s.o.) geerntet.

2.2.2 Oberflächensterilisation von Pflanzensamen

Für die sterile Kultivierung von Pflanzen auf den in Kap. 2.1.4.1 genannten Medien ist eine Aussaat oberflächensteriler Samen nötig.

Die Oberflächensterilisation von *Arabidopsis*-Samen erfolgte gemäß einem Standardprotokoll (<http://www.gabi-kat.de/faq/sul-selection-scheme.html>).

Die Oberflächensterilisation von Tabaksamen erfolgte durch 15-minütige Inkubation der Samen in Sterilisationslösung, einminütige Inkubation in 70%igem EtOH und fünf abschließende Waschschrte in sterilem Leitungswasser (Separation der Samen zwischen den Waschschrten durch Zentrifugation: 1 min, 10000 rpm, Tischzentrifuge).

Sterilisationslösung: 15 Vol.-% DanKlorix (Colgate-Palmolive), 0,03 Vol.-% Tween 20

2.2.3 Sterilisation von Lösungen, Geräten und GVO

Die Sterilisation von Lösungen, Puffern und Geräten sowie die Inaktivierung gentechnisch veränderter Organismen (GVO) erfolgten in einem Varioklav-75S-Dampfsterilisator (Thermo Fisher) bei 120 °C und 55 kPa für 20 Minuten.

2.2.4 Plastidentransformation

Die stabile Transformation von Plastiden erfolgte mit Modifikationen nach dem Protokoll von Svab und Maliga (1993). Die Klonierung der Transformationsvektoren ist von Zoschke et al. (2010) beschrieben, die Vektoren sind sequenziert, die Sequenzen sind in der NCBI-Gendatenbank hinterlegt (FN396957 - FN396960) bzw. im Ergebnisteil beschrieben (s. Kap. 3.1.1). Der Resistenzmarker (*aadA*-Kassette) wurde von Koop et al. beschrieben (1996). Sterile Tabakblätter (Pflanzen auf MS kultiviert, s. Kap. 2.1.4.1) wurden ÜN mit der Blattunterseite nach oben auf MS-Platten ausgelegt und mit Hilfe des Biolistic® PDS-1000/He Particle Delivery Systems (Bio-Rad) mit Goldpartikeln (0,6 µM, Bio-Rad, beladen mit dem Transformationsvektor, gemäß

Hersteller) beschossen (1100 psi, L2 = 6 cm, 10 Schuss je Konstrukt). Spectinomycinresistente Kalli wurden auf RMOP-Medium regeneriert (2 - 4 Runden), auf MS-Medium bewurzelt und zur Samengewinnung auf Erde umgesetzt. Die Integration von *aadA*-Kassette bzw. HA-Epitop wurde durch PCR, Southern-Hybridisierungen, immunologisch und durch Keimungstests der F₁-Generation auf selektivem Medium geprüft (s. Kap. 3.1.2 und Kap. 3.1.4).

2.2.5 Chloroplastenisolation, Stroma- und Membranextraktion

Chloroplasten aus Mais- und Tabakblättern (s. Kap. 2.2.1) wurden nach dem Protokoll von Voelker und Barkan (1995) isoliert. Die Isolation von *Arabidopsis*-Chloroplasten erfolgte nach Kunst (1998), abweichend wurden die Chloroplasten bei 500g pelletiert und 40%-80%-Percoll-Stufengradienten (bei 6500g) verwendet.

Es folgte die Lyse der Chloroplasten (Zoschke et al., 2010). Membran- und Stromafraktionen wurden durch Zentrifugation (Tabak, *Arabidopsis*: 30 min, 13000 rpm, 4 °C Tischzentrifuge) bzw. Ultrazentrifugation (Mais: 30 min, 45000 rpm, 4 °C, L8-70M, Rotor 75 Ti, Beckman) separiert. Der Proteingehalt des Stromas wurde bestimmt (s. Kap. 2.2.13), die Lagerung erfolgte in 10 Vol.-% Glycerol bei -80 °C.

Die Membranfraktion wurde direkt verwendet (s. Kap. 2.2.14) bzw. nach einem Waschschritt in Ex-Puffer durch Zentrifugation separiert (s.o.) und in Thylakoidpuffer aufgenommen. Der Gehalt an Chlorophyll *a* und *b* wurde in 80 Vol.-% Aceton photometrisch bestimmt (Porra et al., 1989), die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

Ex-Puffer: 200 mM KAc, 30 mM HEPES-KOH (pH 8,0), 10 mM MgAc₂, 2 mM DTT, 0,1 Vol.-% RiboLock™ RNase Inhibitor (Fermentas), 0,4 mM PMSF, 1 µg/ml Leupeptin, 0,1 µg/ml Pepstatin A, 0,1 µg/ml Aprotinin

Thylakoidpuffer: 100 mM Sorbitol, 10 mM HEPES-KOH (pH 8,0), 5 mM NaCl, 5 mM MgCl₂

2.2.6 Messungen physiologischer Parameter der Photosynthese

Physiologische Parameter der Photosynthese wurden in Kooperation mit Dr. Schöttler bestimmt, die Methoden sind beschrieben (Aronsson et al., 2008; Schöttler et al., 2007).

2.2.7 Identifikation von Mu-Insertionslinien (Mu-Screen)

Mutante *P67*-Allele wurden in einem reversen genetischen *Screen* aus einer Samenbank mit rund 2300 Mu-induzierten, nichtphotosynthetischen Maismutanten gewonnen (<http://chloroplast.uoregon.edu>). Dazu wurden PCR-Amplifikationen mit gen- und Mu-spezifischen *Primern* (s. Tab. 4) auf vereinigten DNA-Proben aus Mutanten ausgeführt (Williams und Barkan, 2003, <http://chloroplast.uoregon.edu/index.htm.old>).

2.2.8 Isolation und Reinigung von Nukleinsäuren, Sequenzierung

2.2.8.1 DNA-Extraktion

Die Isolation von DNA aus Pflanzenmaterial erfolgte mit Modifikationen nach der Methode von Murray und Thompson (1980). Dabei folgte nach Homogenisierung des Pflanzenmaterials eine 30-minütige Inkubation bei 60 °C in 2x CTAB (ca. 1 ml je 300 mg Homogenat). Nach zweimaliger Extraktion mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) wurde die DNA durch Zugabe von 0,66 Vol. Isopropanol gefällt (Sambrook und Russell, 2001). Es folgten eine Reinigung in 70%igem EtOH, die Aufnahme in *A. bidest* und die Behandlung mit RNase A (Fermentas).

2x CTAB: 2 % CTAB (w/v), 100 mM Tris-HCl (pH 8,0), 20 mM EDTA (pH 8,0), 1,4 M NaCl

Für die Genotypisierung per PCR wurde DNA mit Hilfe des Extract-N-Amp[™]-Plant-PCR-Kits (Sigma) entsprechend dem Herstellerprotokoll isoliert.

2.2.8.2 Plasmidpräparation

Plasmidpräparationen aus *E.-coli*-Kulturen in kleinem Maßstab erfolgten nach dem Protokoll zur alkalischen Lyse und Plasmidpräparation (Sambrook und Russell, 2001). Es folgten RNase-A-Behandlung (Fermentas) und vor der Sequenzierung eine Reinigung über QIAquick-Säulchen (Qiagen, PCR-*Purification*-Protokoll).

Plasmidpräparationen aus *E.-coli*-Kulturen in größerem Maßstab erfolgten mit dem Plasmid-Midi-Kit bzw. dem Plasmid-Maxi-Kit (Qiagen, nach Herstellerprotokoll).

2.2.8.3 Reinigung von DNA-Fragmenten, Sequenzierung

PCR-Produkte wurden über QIAquick-Säulchen gereinigt (Qiagen, PCR-*Purification*-Protokoll bzw. Gel-*Extraction*-Protokoll).

Sequenzierungen von Plasmiden und PCR-Fragmenten wurden durch die Firma SMB mit Hilfe eines ABI 377 DNA Sequencers (Applied Biosystems) ausgeführt.

2.2.8.4 RNA-Extraktion

Die Extraktion von RNA aus Pflanzenmaterial erfolgte mit Hilfe des TRIzol[®]-Reagenzes (Invitrogen) gemäß den Angaben des Herstellers.

2.2.8.5 Quantifizierung und Qualitätskontrolle

Die Bestimmung der Konzentration und der Qualität von Nukleinsäurelösungen erfolgten spektrophotometrisch mit Hilfe des Nanodrop 1000 (peqLab) und durch Gelelektrophorese bzw. Northern-Transfer (s. Kap. 2.2.9.1 und Kap. 2.2.9.6).

2.2.9 Elektrophorese und Transfer von Nukleinsäuren

2.2.9.1 DNA-Gelelektrophorese

Die DNA-Gelelektrophorese diente der Längenanalyse, Mengenabschätzung, Qualitätskontrolle und Reinigung von DNA sowie der Vorbereitung zum Southern-Transfer (s. Kap. 2.2.9.2). Die DNA wurde mit 0,25 Vol. 5x DNA-Ladepuffer gemischt und auf 0,8 - 2%igen Agarosegelen (w/v, in 1x TAE, inkl. 0,2 µg/ml EtBr) parallel zu 0,5 µg eines Größen- und Mengenstandards (GeneRuler[™] 1 kb DNA *Ladder*, 100 bp Plus DNA *Ladder*, Fermentas) in 1x TAE aufgetrennt (Sambrook und Russell, 2001). Es wurden horizontale Elektrophoresesysteme der Firma peqLab verwendet (PerfectBlue-Gelsystem Mini bzw. -Midi). Die angelegte Spannung betrug 5 - 10 V/cm. DNA-Banden wurden unter UV-Licht sichtbar gemacht und dokumentiert (Gel Doc[™] XR, Bio-Rad).

5x DNA-Ladepuffer: 50 Vol.-% Glycerol, 10 Vol.-% 50x TAE, 0,1 % (w/v) Bromphenolblau, 0,1 % (w/v) Xylencyanol

Laufpuffer 1x TAE: 2 Vol.-% 50x TAE

2.2.9.2 DNA-Transfer (Southern-Transfer)

Gelelektrophoretisch aufgetrennte DNA wurde mit Modifikationen nach der Methode von Southern (1975) auf eine Nylonmembran transferiert. Um Doppelstrangbrüche in längere Fragmente einzuführen (Erhöhung der Transfereffizienz), wurde die DNA im Gel mit UV-Licht bestrahlt (250 mJ, GS-GeneLinker-UV-Kammer, Bio-Rad). Nach zwei 15-minütigen Inkubationen in Denaturierungspuffer und einer zehnminütigen Inkubation in Neutralisationspuffer wurde die aufgetrennte DNA in 5x SSC auf eine Nylonmembran (Hybond™-N+, Amersham Biosciences) überführt (Southern, 1975). Eine Immobilisierung der DNA auf der Membran erfolgte durch UV-Bestrahlung (150 mJ, GS-GeneLinker-UV-Kammer, Bio-Rad). Anschließend wurde die Membran direkt für die Hybridisierung mit DNA-Sonden genutzt oder trocken bei RT gelagert.

Denaturierungspuffer: 1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH

DNA-Transferpuffer: 5x SSC: 25 Vol.-% 20x SSC

Neutralisationspuffer: 1,5 M NaCl, 1 M Tris-HCl (pH 7,5)

2.2.9.3 Herstellung von *Macroarrays*

Für die Analyse coimmunopräzipitierter RNA (s. Kap. 2.2.17.2) wurden *Macroarrays* hergestellt. PCR-Sonden wurden mit der BIO-DOT-Apparatur (Bio-Rad) und einer Vakuumpumpe (Cole-Parmer) als Duplikate auf eine Nylonmembran übertragen (Hybond™-N+, Amersham Biosciences, je 1 µg Sonde, denaturiert durch zehnminütige Inkubation in 0,5 M NaOH bei 95 °C). Nach zweimaligem Spülen der Anlage mit 100 µl 0,5 M NaOH erfolgte die Immobilisierung der DNA auf der Membran durch UV-Bestrahlung (250 mJ, GS-GeneLinker-UV-Kammer, Bio-Rad). Die Membran wurde zweimal für fünf min in 2× SSC gespült und direkt für die Hybridisierung mit radioaktiv markierter cDNA genutzt oder trocken bei RT gelagert.

2.2.9.4 Herstellung von *Microarrays*

Die verwendeten Tabak-Chloroplastengenom-*Tiling-Arrays* sind von Prof. Dr. Sugiura zur Verfügung gestellt worden (Nakamura et al., 2003). Tabak-*trnK*-Oligonukleotid-*Tiling-Arrays* wurden mit Hilfe des OmniGrid® Accent (Zinsser) auf GAPS II *Coated*

Slides (Corning) gedruckt (Schmitz-Linneweber et al., 2005a; Zoschke et al., 2010). Mais-Chloroplastengenom-*Tiling-Arrays* wurden wie von Schmitz-Linneweber et al. (2005a) beschrieben hergestellt.

Unmittelbar vor der Verwendung (s. Kap. 2.2.17.1) wurden die *Microarrays* mit UV-Licht bestrahlt (s. Kap. 2.2.9.3, Immobilisierung der Sonden), für 2 h bei 42 °C in BSA-Lösung inkubiert, kurz in *A. bidest* und Isopropanol gewaschen und bei 1500 rpm (Multifuge 1S-R, Thermo Fisher) für 3 min bei RT trockenzentrifugiert.

BSA-Lösung: 25 Vol.-% 20x SSC, 1 % (w/v) BSA, 0,1 % (w/v) SDS

2.2.9.5 RNA-Gelelektrophorese

Die RNA-Gelelektrophorese diente der Vorbereitung zum Northern-Transfer. Die RNA wurde mit 4 Vol. RNA-Probenpuffer gemischt und für 15 min bei 75 °C denaturiert. Nach Zugabe von 0,1 Vol. 10x RNA-Ladepuffer wurde die RNA auf 1 - 2%igen RNA-Agarosegelen (w/v) parallel zu 1 µl (0,5 µg) eines Größenstandards (RiboRuler™ RNA Ladder, High Range bzw. Low Range, Fermentas) in 1x MEN (pH 7,0) aufgetrennt. Es wurden horizontale Elektrophoresesysteme der Firma bsb11 biotech verwendet (Midilarge blu). Die angelegte Spannung betrug 5 - 10 V/cm.

10x RNA-Ladepuffer: 50 Vol.-% Glycerol, 10 Vol.-% 10x MEN (pH 8,0), 10 mM EDTA (pH 8,0), 0,25 % (w/v) Bromphenolblau, 0,25 % (w/v) Xylencyanol; steril filtriert

Formaldehydlösung: 36,5 - 38 % (w/v) Formaldehyd, 10 - 15 % (w/v) MeOH (Fertiggemisch für die Molekularbiologie, Sigma)

Laufpuffer 1x MEN: 10 Vol.-% 10x MEN (pH 7,0), 10 Vol.-% Formaldehydlösung

RNA-Agarosegel: 1 - 2 g Certified™ Molecular Biology Agarose (Bio-Rad) in 113 ml H₂O aufkochen, auf 65 °C abkühlen und 15 ml 10x MEN (pH 8,0) und 26 ml Formaldehydlösung zusetzen

RNA-Probenpuffer: 62,5 Vol.-% deionisiertes Formamid, 25 Vol.-% Formaldehydlösung, 12,5 Vol.-% 10x MEN (pH 8,0)

2.2.9.6 RNA-Transfer (Northern-Transfer)

Nach 15-minütiger Inkubation des Agarosegels in 5x SSC wurde die RNA, wie in Kap. 2.2.9.2 beschrieben, auf eine Nylonmembran (Hybond™-N, Amersham Biosciences) transferiert. Die Immobilisierung der RNA und die Lagerung der Membran erfolgten wie beschrieben (s. Kap. 2.2.9.2). Zur Mengenstandardisierung und Qualitätskontrolle wurden abundante (ribosomale) RNA-Banden durch Färbung mit Methylblau sichtbar gemacht (30 s Inkubation in Methylblaulösung, Entfärben durch Waschen in *A. bidest*) und durch Einscannen dokumentiert.

Methylblaulösung: 0,3 M NaAc (pH 5,2), 0,03 % (w/v) Methylblau

2.2.10 Markierung von DNA-Sonden

Die Volllängenmarkierung von DNA-Sonden (PCR-Produkte) unter Einbau von [α^{32} -P]-dCTP (PerkinElmer) erfolgte mit dem HexaLabel™ DNA Labeling Kit bzw. dem DecaLabel™ DNA Labeling Kit (Fermentas) den Herstellerangaben folgend.

Die 5'-Endmarkierung von DNA-Oligonukleotidsonden erfolgte mit der T4-Polynukleotidkinase (Fermentas) und [γ^{32} -P]-ATP (PerkinElmer) gemäß dem Herstellerprotokoll (*forward reaction*).

Freie Radioaktivität wurde nach Herstellerangaben mit illustra MicroSpin G25- bzw. G-50 Säulchen (GE Healthcare) von Oligonukleotid- bzw. PCR-Sonden getrennt.

Digoxigenin-markierte DNA-Sonden wurden nach einem Protokoll von Prof. Dr. Alice Barkan erzeugt (<http://chloroplast.uoregon.edu/index.htm.old>).

Die Sonden wurden vor der Verwendung (s. Kap. 2.2.11) denaturiert (10 min, 95°C).

2.2.11 Hybridisierung und Detektion von DNA-Sonden

Die Hybridisierung von DNA-Sonden (PCR-Produkte, s. Kap. 2.2.10) mit DNA und Gesamt-RNA erfolgte bei 60 °C ÜN, die mit copräzipitierter RNA erfolgte bei 53 °C für 6 h in Church-Puffer (s. Kap. 2.2.9.2 und Kap. 2.2.9.6). Die Hybridisierung von DNA-Sonden (PCR-Produkte bzw. Oligonukleotide, s. Kap. 2.2.9.3 bzw. Kap. 2.2.10) mit cDNA bzw. RNA erfolgte bei 48 °C bzw. 50 °C ÜN in Church-Puffer (s. Kap. 2.2.17.2 bzw. Kap. 2.2.17.3).

Die Membranen wurden in vorgewärmten Puffern (s. Hybridisierungstemperatur) je

10 min wie folgt gewaschen: zweimal in 1x SSC, 0,5 % SDS; einmal in 0,5x SSC, 0,1 % SDS; optional: einmal in 0,2x SSC, 0,1 % SDS (% in w/v). Detektion der Sonden und Signal-Quantifizierung erfolgten mit einem Phosphorimagersystem (PMI FX, Eraser Screen-K, Quantity-One-Software, Bio-Rad).

Church-Puffer: 0,5 M Natriumphosphatpuffer (pH 7,0 mit H₃PO₄), 7 % (w/v) SDS, 1 mM EDTA (pH 8,0)

Zur Identifikation von Mu-Insertionslinien wurden digoxigeninmarkierte DNA-Sonden, wie unter <http://chloroplast.uoregon.edu/index.htm.old> beschrieben, hybridisiert und detektiert. RIP-Chip-Hybridisierungen sind gesondert beschrieben (s. Kap. 2.2.17.1).

2.2.12 Isolation von Proteinen

Die Isolation von Proteinen aus Pflanzengewebe erfolgte mit Modifikationen nach dem Protokoll von Barkan (1998). Das Homogenat aus Pflanzengewebe wurde mit frischem Proteinisolationpuffer gemischt (300 mg/1 ml). Z.T. wurden lösliche- und unlösliche Zellbestandteile durch zehnmündige Zentrifugation separiert (13000 rpm, Tischzentrifuge). Die unlösliche Fraktion wurde in Proteinisolationpuffer emulgiert.

Proteinisolationpuffer: 100 mM Tris-HCl (pH 7,2), 40 mM 2-MeEtOH, 10 % (w/v) Saccharose, 5 mM EDTA (pH 8,0), 5 mM EGTA (pH 8,0), 2 µg/ml Aprotinin, 2 mM PMSF

2.2.13 Quantifizierung von Proteinlösungen

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen erfolgte mit dem Bio-Rad Protein Assay den Herstellerangaben folgend (gegen BSA-Eichgerade). Die photometrischen Messungen wurden mit dem Lamda 35 UV/Vis Spektrometer (PerkinElmer) ausgeführt.

2.2.14 Elektrophorese und Transfer von Proteinen

2.2.14.1 Denaturierende Protein-Gelelektrophorese

Die denaturierende Gelelektrophorese von Proteinen wurde im Puffersystem von Laemmli nach Standardmethoden ausgeführt (Laemmli, 1970; Sambrook und Russell, 2001). Sie diente der Qualitätskontrolle und Quantifizierung von Proteinlösungen sowie

der Vorbereitung zum Western-Transfer. Proteinlösungen wurden mit 0,5 Vol. Proteinladepuffer gemischt, für 10 min bei 65 °C denaturiert und auf Standard-SDS-Polyacrylamidgelen (5 % Sammel-, 13 % Trenngel) parallel zu 5 µl eines Größen- bzw. Mengenstandards (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Unstained Protein Molecular Weight Marker, Fermentas) in 1x SDS-Laufpuffer aufgetrennt. Es wurden vertikale Elektrophoresesysteme verwendet (Mini-Protean®, Bio-Rad, Spannung: 70 - 80 V).

Proteine wurden durch Coomassiefärbung sichtbar gemacht (Waschen in *A. bidest*, 1 h Inkubation in Coomassielösung, 2 h Entfärben in Entfärbelösung) und durch Einscannen dokumentiert, sofern nicht dem Protein-Transfer zugeführt (s. Kap. 2.2.14.2). Die Silberfärbung von Proteinen vor der massenspektrometrischen Analyse erfolgte mit dem SilverQuest™ Kit (Invitrogen) gemäß den Angaben des Herstellers.

1x SDS-Laufpuffer:	10 Vol.-% 10x SDS-Laufpuffer (s. Kap. 2.1.5)
3x Proteinladepuffer:	30 Vol.-% Glycerol, 15 Vol.-% 2-MeEtOH, 7 % (w/v) SDS, 200 mM Tris-HCl (pH 6,8), 0,25 % (w/v) Bromphenolblau
Coomassielösung:	25 Vol.-% Isopropanol, 10 Vol.-% Essigsäure, 0,05 % (w/v) Coomassie® Brilliant Blue-R250 (Merck)
Entfärbelösung:	10 Vol.-% Essigsäure, 10 Vol.-% Isopropanol
Sammelgel:	5 Vol.-% Acrylamid, 130 mM Tris-HCl (pH 6,8), 0,1 % (w/v) SDS, 0,1 % (w/v) APS, 0,1 Vol.-% TEMED
Trenngel:	13 Vol.-% Acrylamid, 375 mM Tris-HCl (pH 8,8), 0,1 % (w/v) SDS, 0,1 % (w/v) APS, 0,05 Vol.-% TEMED

2.2.14.2 Protein-Transfer (Western-Transfer)

Gelelektrophoretisch aufgetrennte Proteine wurden im Tank-*Blot*-System (Mini Trans-Blot Cell, Bio-Rad) in 1x Transferpuffer elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran (Hybond™-C Extra, Amersham Biosciences) überführt. Der Transfer erfolgte ÜN bei 4 °C mit einer angelegten Spannung von 40 V. Zur Mengenstandardisierung und Qualitätskontrolle wurden abundante Proteine durch Ponceaufärbung sichtbar gemacht (5 min Inkubation in Ponceaulösung, mehrmaliges Waschen mit *A. bidest*) und durch

Einscannen dokumentiert. Anschließend wurde die Membran direkt für die Immundetektion genutzt oder trocken bei RT gelagert.

1x Transferpuffer: 20 Vol.-% 5x Transferpuffer (s. Kap. 2.1.5), 20 Vol.-% MeOH
Ponceaulösung: 30 % (w/v) Trichloressigsäure, 30 % (w/v) 5-Sulfosalicylsäure, 2 % (w/v) Ponceau S (Merck)

2.2.15 Immunodetektion

Die Visualisierung ausgewählter Proteine auf Nitrozellulosemembranen erfolgte durch Immunodetektion. Nach dem Blockieren freier Bindungsstellen auf der Membran (30-minütige Inkubation in Blockierungslösung) erfolgte eine einstündige Inkubation in Antikörperlösung mit primärem Antikörper (s. Tab. 2, S. 120). Nach kurzem Waschen in *A. bidest* und vier fünfminütigen Waschschritten in 1x TBST wurde die Membran für 1 h mit Antikörperlösung mit sekundärem Antikörper inkubiert (s. Tab. 2, nicht bei HA-AK-HRP als primärem Antikörper). Es folgten vier 15-minütige Waschschrritte in 1x TBST und die Detektion des an den sekundären Antikörper gekoppelten Enzyms HRP (Meerrettichperoxidase) durch Chemilumineszenz (SuperSignal[®] West Pico Chemiluminescent Substrate Kit, Thermo Fisher, gemäß Herstellerprotokoll). Alle Schritte wurden bei RT ausgeführt. Die Signale wurden mit Röntgenfilmen (Hyperfilm[™] MP, Amersham Biosciences) und/oder dem Lumi-Imager F1 (Roche) dokumentiert.

Die Immunodetektion von P67 auf Fraktionen aus Immunopräzipitationen erfolgte mit dem ONE-HOUR IP-Western Kit (Rabbit, GenScript) den Herstellerangaben folgend.

1x TBST: 10 Vol.-% 10x TBST
Antikörperlösung: 2 % (w/v) Trockenmilch, 15 mM EDTA, Antikörper (in verschiedenen Verdünnungen, s. Tab. 2) in 1x TBST
Blockierungslösung: 4 % (w/v) Trockenmilch, 15 mM EDTA in 1x TBST

2.2.16 Immunopräzipitationen

Je Immunopräzipitation wurden 100 - 200 µl Stroma (0,5 - 1 mg Protein) mit 1 µl RiboLock[™] RNase Inhibitor (Fermentas) behandelt (nicht vor DIP-Chip-Analysen, s. unten). Für RIP-Chip- bzw. DIP-Chip-Analysen (RNA- bzw. DNA-Immunopräzipitatio-

nen und Chip-Hybridisierungen) von P67 erfolgte eine DNase- bzw. RNase-Behandlung des Stroma wie von Prikryl et al. (2008) beschrieben. Protein-A-Sepharose (Rec. Protein A - Sepharose[®] 4B, Invitrogen) wurde in Co-IP-Puffer gewaschen (drei Waschschriffe, Separation der Sepharose in Tischzentrifuge, 2000 rpm, 4 °C, 30 s) und aufgenommen (Ausgangsvolumen). Alle folgenden Inkubationen wurden bei 4 °C drehend auf einem Rotator ausgeführt (Intelli-Mixer, Programm C3, 50 rpm, neoLab). Das Stroma wurde für 10 min mit 100 µl Protein-A-Sepharose inkubiert. Nach Trennung von Stroma und Sepharose durch Zentrifugation (13000 rpm, 4 °C, 5 min, Tischzentrifuge) wurden 5 µl des HA-AK bzw. des P67-AK zum Stroma gegeben. Es folgten eine einstündige Inkubation, die Zugabe von 100 µl Protein-A-Sepharose und eine weitere einstündige Inkubation. Die Überstandsfraktion wurde durch Zentrifugation (2000 rpm, 4 °C, 30 s, Tischzentrifuge) von der Sepharose (Pellet) getrennt. Das Pellet wurde durch dreimaliges Waschen in Co-IP-Puffer gereinigt (s.o.). Teile beider Fraktionen wurden direkt für die Proteingelektrophorese verwendet (s. Kap. 2.2.14.1). Aus Pellet- bzw. Überstandsfraktion wurde durch phenolische Extraktion und Ethanol-fällung RNA oder DNA isoliert (Sambrook und Russell, 2001), in 20- bzw. 30 µl *A. bidest* aufgenommen und weiterverwendet (s. Kap. 2.2.17) bzw. bei -80 °C gelagert. Vor DIP-Chip-Analysen erfolgte die alkalische Hydrolyse der RNA (Prikryl et al., 2008).

Co-IP-Puffer: 0,15 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 2 mM MgCl₂,
 0,5 Vol.-% Nonidet P-40, 5 µg/ml Aprotinin, 0,1 Vol.-%
 RiboLock[™] RNase Inhibitor (Fermentas)

2.2.17 Analyse von RNA und DNA aus Immunopräzipitationen

2.2.17.1 RIP-Chip, DIP-Chip

Die Immunopräzipitation ist in Kap. 2.2.16 beschrieben. RIP-Chips (Schmitz-Linneweber et al., 2005a) bzw. DIP-Chips (RNA- bzw. DNA-Immunopräzipitationen und Chip-Hybridisierungen) mit P67-AK wurden wie von Prikryl et al. (2008) beschrieben, RIP-Chips mit HA-AK wie bei Zoschke et al. (2010) gezeigt, ausgeführt. Die Markierung der copräzipitierten Nukleinsäuren erfolgte mit dem ASAP Micromax Labeling Kit entsprechend den Herstellerangaben (Pelletfraktion mit Cy5, Überstandsfraktion mit Cy3, PerkinElmer). Die Hybridisierung erfolgte im Hybridisierungspuffer III des Markierungskits bei 58 °C, 50 °C bzw. 40 °C (Mais-, Tabak-Chloro-

plastengenom- bzw. Tabak-*trnK*-Oligonukleotid-*Tiling-Arrays*). Das Waschen der *Microarrays* erfolgte wie bei Zoschke et al. (2010) beschrieben, wobei die Tabak- und Mais-Chloroplastengenom-*Tiling-Arrays* gleich behandelt wurden. Die *Microarray*-Signale wurden mit dem Scanarray-Gx-Gerät (PerkinElmer) eingelesen und wie bei Zoschke et al. (2010) beschrieben ausgewertet.

2.2.17.2 Reverse Transkription in radioaktiv markierte cDNA

Fractionen coimmunopräzipitierter RNA (12 µl) wurden mit Hilfe des QuantiTect Rev. Transcription Kits (Qiagen) in radioaktiv markierte cDNA umgeschrieben. Die reverse Transkription wurde in doppelten Mastermixen (40 µl) mit je 5,33 µl [$\alpha^{32}\text{P}$]-dCTP, [$\alpha^{32}\text{P}$]-dGTP, [$\alpha^{32}\text{P}$]-dATP (PerkinElmer, je 6000 Ci/mmol), 1 µl dTTP (10 mM), 5 µl 8x RT-Puffer (ohne dNTPs, Qiagen), 2 µl *Primer-Mix*, 2 µl Reverser Transkriptase und 14 µl RNA (DNase-behandelt laut Herstellerprotokoll) ausgeführt. Ansonsten folgte die reverse Transkription den Angaben des Herstellerprotokolls.

Freie Radioaktivität wurde nach Herstellerangaben mit illustra MicroSpin G-50 Columns (GE Healthcare) abgetrennt. Die cDNA wurde vor der Verwendung (s. Kap. 2.2.11) denaturiert (5 min, 96 °C). Die Hybridisierung der markierten cDNA auf *Macroarrays* ist an anderer Stelle beschrieben (s. Kap. 2.2.11).

2.2.17.3 Transfer auf Nylonmembranen (*Slot-Blot*)

Der Transfer von RNA-Fractionen aus Immunopräzipitationen erfolgte mit Modifikationen nach dem Protokoll von Schmitz-Linneweber et al. (2005a). Je ein Drittel der präzipitierten und ein Zehntel der freien RNA wurden nach Zugabe von 0,33 Vol. *Slot-Blot*-Puffer denaturiert (10 min 70 °C), mit 1 Vol. 20x SSC gemischt und mit der PR-648-*Slot-Blot*-Manifold-Apparatur (Amersham Biosciences) und einer Vakuumpumpe (Cole-Parmer) auf eine Nylonmembran übertragen (HybondTM-N, Amersham Biosciences). Die Anlage wurde mit 1 ml 10x SSC gespült. Immobilisierung der RNA und Lagerung der Membran erfolgten wie beschrieben (s. Kap. 2.2.9.2). Die Hybridisierung der Membranen mit DNA-Sonden ist in Kap. 2.2.11 beschrieben.

Slot-Blot-Puffer: 66 Vol.-% deionisiertes Formamid, 21 Vol.-% Formaldehydlösung (s. Kap. 2.2.9.5), 13 Vol.-% 10x MEN (pH 7,0)

2.2.18 Massenspektrometrie

Immunpräzipitierte Proteine (HA-AK) aus Kontroll- und HA-*Tag*-Pflanzenmaterial wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und mittels Silberfärbung sichtbar gemacht (s. Kap. 2.2.14.1). Spezifische Proteinbanden der HA-*Tag*-Fraktion und der entsprechende Größenbereich der Kontrollfraktion wurden ausgeschnitten, mit Trypsin verdaut (Shevchenko et al., 1996) und durch Frau Dr. Waltraud Schulze wie beschrieben mittels Massenspektrometrie und Homologieabgleich untersucht (Pertl et al., 2009).

2.2.19 Bakterienanzucht

E. coli wurde in LB-Medium (mit oder ohne Agar, s. Kap. 2.1.4.2) unter Standardbedingungen kultiviert (Sambrook und Russell, 2001). Die Bedingungen für die Expression rekombinanter Polypeptide in *E. coli* sind in Kap. 2.2.21 beschrieben.

2.2.20 Transformation chemisch kompetenter *E.-coli*-Zellen

2 - 5 µl einer Standardligationsreaktion wurden zu 50 µl chemisch kompetenter *E.-coli*-Top10-Zellen gegeben (Invitrogen), für 15 min auf Eis inkubiert und für 90 s auf 42 °C erhitzt (Hitzeschock). Es folgte eine einstündige Inkubation in 1 ml SOC-Medium (37 °C, schüttelnd bei 220 rpm) und die Selektion positiver Klone auf LB-Medium mit Agar (inkl. Antibiotika entsprechend den plasmidkodierten Resistenzen).

2.2.21 Heterologe Expression rekombinanter Polypeptide in *E. coli*

Für die Herstellung eines P67-Antikörpers wurde ein Epitop des P67-Proteins aus Mais heterolog in *E. coli* exprimiert (AS 441 - 691, s. Abb. 21, S. 71). Dazu wurde die DNA-Sequenz des Epitops PCR-basiert mit Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen versehen (NdeI bzw. BamHI, *Primer* NdePPR52for und BamPPR52rev, s. Tab. 4, S. 121), unter Beibehaltung des Leserahmens in den Vektor pET-15b (Novagen) ligiert (T4-DNA-Ligase, Fermentas, Herstellerprotokoll), kloniert (s. Kap. 2.2.20) und amplifiziert (s. Kap. 2.2.8.2.). Die Sequenz wurde geprüft. Die Expression des Epitops erfolgte in *E.-coli*-BL21(DE3)-Zellen (Novagen, gemäß Vektorherstellerprotokoll). Ca. 2,5 mg des Epitops wurden aus einem Coomassie-gefärbten Polyacrylamidgel ausgeschnitten (s. Kap. 2.2.14.1), ÜN in *A. bidest* gewaschen und der Firma Eurogentec zur Antikörperproduktion zur Verfügung gestellt.

2.2.22 Reinigung des P67-Antiserums

Die Reinigung des Antikörpers erfolgte gemäß Herstellerprotokoll über antigengekoppelte Affigel 10 Säulchen (Bio-Rad).

2.2.23 Analyse der MatK-Expressionsregulation in *E. coli*

Die Untersuchungen zur Regulation der MatK-Expression im heterologen System wurden wie von Singh et al. (2002) und Zoschke et al. (2009) beschrieben ausgeführt.

2.2.24 PCR

Zur Amplifikation von DNA (in verschiedenen Anwendungen) wurden die folgenden Enzyme gemäß Herstellerangaben verwendet: Taq DNA Polymerase (Sondenherstellung, Test-PCRs, Qiagen), Ex Taq™ (Mu-Screen, s. Kap. 2.2.7, TAKARA), Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (Klonierungen, NEB), Extract-N-Amp™ Plant Kit Taq (Pflanzengenotypisierung, Sigma). Die Zyklenzahlen lagen zwischen 25 und 40 (je nach Anwendung). Die *Primer*-Hybridisierungstemperaturen lagen 2 - 5°C unter den berechneten Schmelztemperaturen. Die verwendeten *Primer* sind in Tab. 4 (S. 121) dargestellt.

2.2.25 Reverse Transkription

Verwendet wurde das QuantiTect Rev. Transcription Kit (Qiagen, Herstellerangaben).

2.2.26 Verwendung von Restriktionsendonukleasen

Restriktionsenzyme (Fermentas) wurden den Herstellerangaben folgend verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der putativen plastidären Maturase MatK

3.1.1 Markierung von *matK* mit der HA-Epitopsequenz

Die plastidäre Maturase MatK ist schwach exprimiert und dementsprechend schwer nachzuweisen (Barthet und Hilu, 2007b; du Jardin et al., 1994). Überdies zeigen die verfügbaren polyklonalen MatK-Antikörper eine geringe Spezifität, die für die beabsichtigten Experimente, z.B. die Immunopräzipitation, inadäquat erscheint (Barthet und Hilu, 2007b; du Jardin et al., 1994). Um diese Probleme zu umgehen, sollte MatK in der vorliegenden Arbeit durch Plastidentransformation stabil mit einem Epitop markiert werden. Dies ermöglicht die Anwendung hochaffiner monoklonaler Antikörper für die geplanten umfassenden Analysen der plastidären Maturase (Western, Immunopräzipitation, Analyse copräzipitierter RNA etc.). Das Hämagglutinin-Epitop des Influenzavirus (HA-Epitop, AS 98 - 106) ist dafür ein geeigneter Kandidat, da frühere Arbeiten gezeigt haben, dass die Applikation von HA-spezifischen Antikörpern auf pflanzliche und speziell plastidäre Proteine ein geringes Maß an unspezifischen Kreuzreaktionen verursacht (persönliche Mitteilung Julia Legen, Ferrando et al., 2000; Varet et al., 2003). Dementsprechend wurden für einen transplastomischen Ansatz die Transformationsvektoren pRZN+ bzw. pRZC+ kloniert, die *matK* am 5'- bzw. 3'-Ende mit der Sequenz des HA-Epitops markieren (s. Abb. 6). Die daraus abgeleiteten Kontrollvektoren pRZN- bzw. pRZC- enthalten keine HA-Sequenz und dienen der Prüfung des Einflusses des Resistenzmarkers (*aadA*-Kassette, s. Abb. 6). Diese vier Vektoren wurden für die stabile Transformation der Plastiden in Tabak eingesetzt (Svab et al., 1990). Dabei wird die Plasmid-DNA jeweils auf Goldpartikel präzipitiert, die unter Heliumdruck beschleunigt und auf sterile Tabakblätter geschossen werden. Die Plastiden-penetrierenden Goldpartikel setzen die Plasmid-DNA frei, deren homologe Sequenzen durch Rekombination die entsprechenden Bereiche des Chloroplastengenoms ersetzen können. Unter Selektionsdruck segregieren die so entstandenen Transplastome in den polyploiden Organellen und verdrängen die wildtypischen Plastome. Lediglich Chloroplasten, die während der Zell- und Chloroplastenteilungen Transplastome mit dem Selektionsmarker *aadA* tragen, zeigen Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Spectinomycin, einem Inhibitor der plastidären Translation, und bringen letztlich grüne Sprösslinge hervor.

aus den Transformationen mit pRZN+/pRZN- bzw. pRZC+/pRZC- durch PCR zunächst auf die Insertion der *aadA*-Kassette geprüft (*Primer*-Paare 5' matK-test-rps16, *aadA*-LB-rev bzw. NtpsbArev2, *aadA*-RB-for, Daten nicht gezeigt). Eine erste Analyse des Segregationsstatus erfolgte mit Hilfe einer *Tag*-überspannenden PCR (*Primer*-Paare 5' matk-HA-Test-fw, 5' matk-HA-Test-rev bzw. 3' matkSeq-fw, 3' matkSeq-rev, Daten nicht gezeigt). Die Sprösslinge wurden, nach Bewurzelung, auf Erde umgesetzt und es erfolgte die Prüfung des Segregationsstatus der HA-Epitopsequenz und/oder der *aadA*-Kassette durch Southern-Analyse (s. Abb. 7).

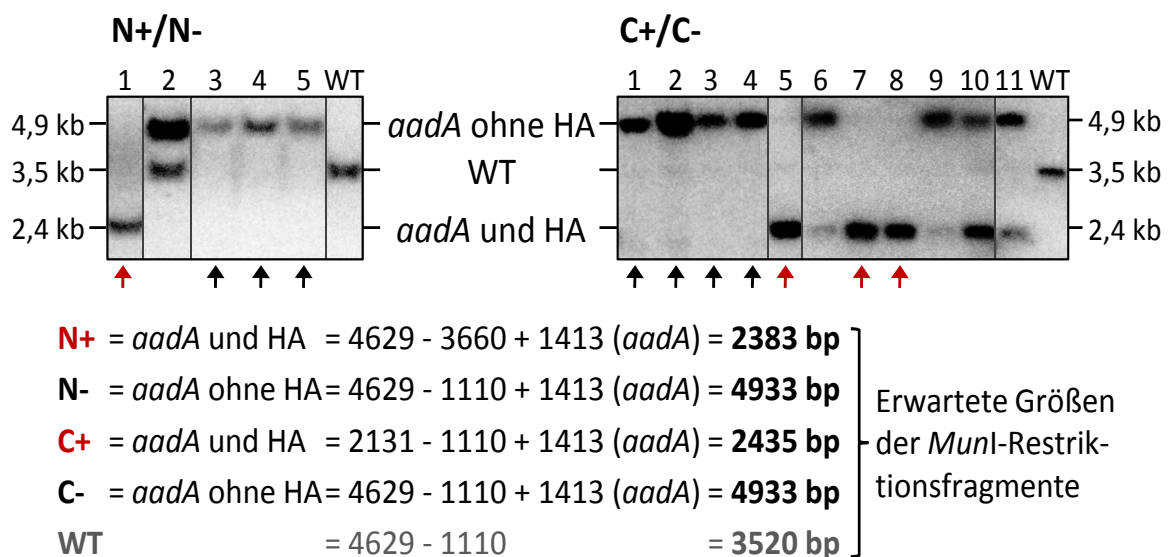


Abb. 7: Southern-Hybridisierung zum Test der Homoplastomie transplastomischer Tabaklinien. Gesamt-DNA wurde mit *MunI* verdaut, gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf Nylonmembranen transferiert und mit konstruktsspezifischen Sonden hybridisiert. Oben links: Detektion der Wildtyp- und Transplastome mit der 5'-Sonde in den Linien N+ und N-. Oben rechts: Detektion mit der 3'-Sonde in den Linien C+ und C-, sonst wie links (Sondenpositionen und Restriktionsstellen s. Abb. 6). Unten: Die gezeigten Restriktionsfragmente korrelieren mit den berechneten Größen (*M* 4629 ist nicht durch Rekombination mit pRZN+ und pRZN- entfernt worden). Basierend auf Größe und Anzahl der Signale wurde der Segregationsstatus bestimmt. Homoplastomische Pflanzen sind mit roten (*aadA* und HA) bzw. schwarzen (*aadA* ohne HA) Pfeilen markiert, heteroplastomische Pflanzen sind unmarkiert (nur z.T. gezeigt). Irrelevante Spuren wurden entfernt (senkrechte Linien). WT = Wildtypkontrolle. Abkürzungen s. Abb. 6.

Die Southern-Hybridisierungen zeigen, dass Pflanzen aus Transformationen mit pRZN+ und pRZN- die in den Vektoren ausgeschaltete *MunI*-Schnittstelle an Position 4629 restituierten, wahrscheinlich durch Rekombination mit dem Wildtypplastom zwischen

der Schnittstelle und der *aadA*-Kassette (s. Abb. 6 und Abb. 7). Dieser Bereich ist ausreichend groß für die Rekombination (z.B. Kavanagh et al., 1999). Desweiteren traten nach der Transformation mit pRZC+ Transformanten mit Plastomen ohne HA-Epitopsequenz, aber mit *aadA*-Kassette auf (s. Abb. 7 rechts, Spuren 6, 9, 10, 11, oberes Signal), was sich durch Rekombinationsereignisse zwischen den Insertionen erklärt.

Der Segregationsstatus der *aadA*-Kassette wurde in der F₁-Generation der homoplastomischen Pflanzen durch Keimungstests auf selektivem Medium bestätigt (s. Abb. 8). Lediglich die Samen homoplastomischer transgener Pflanzen bringen ausschließlich grüne Keimlinge auf spectinomycinhaltigem Medium hervor. Die Nachkommen heteroplastomischer Pflanzen segregieren grüne, weiße und grün-weiß gescheckte Keimlinge, während die Nachkommen wildtypischer Pflanzen ausschließlich weiße Keimlinge hervorbringen. Unter je ~ 1000 selektiv kultivierten Keimlingen der F₁-Generationen der Linien N+, N-, C+, C- wurden keine gebleichten gefunden, was die Homoplastomie bezüglich der *aadA*-Kassette belegt. Zusammen wurden aus den Transformationen elf homoplastomische und zahlreiche heteroplastomische Pflanzen gewonnen. Die homoplastomischen Linien sind, abgeleitet von der Benennung des Transformationsvektors, als N+, N-, C+, C- bezeichnet. Für die weiteren Experimente wurden ausschließlich homoplastomische Pflanzen verwendet.

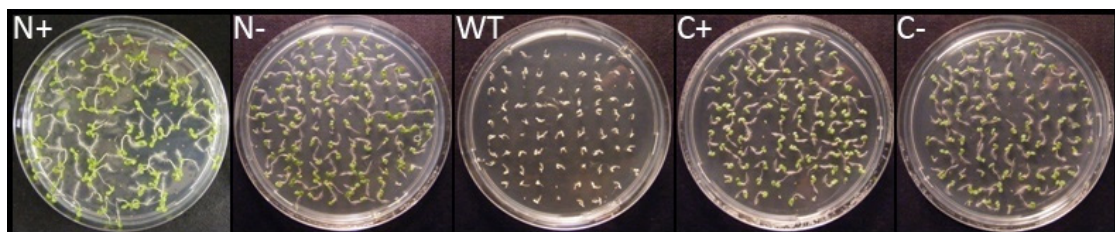


Abb. 8: Keimungstests transplastomischer Samen auf spectinomycinhaltigem Medium zur Demonstration der Homoplastomie. Unter je ca. 1000 untersuchten Keimlingen wurden keine gebleichten gefunden (F₁-Generation der Linien N+, N-, C+, C-). WT-Kontroll-Samen erzeugten ausschließlich weiße Keimlinge. Abkürzungen wie in Abb. 7.

3.1.3 Phänotypen der homoplastomischen Pflanzen

Die homoplastomischen Pflanzen der vier Transformationen zeigten keine Unterschiede im Phänotyp im Vergleich zu wildtypischen Pflanzen (s. Abb. 9). Dies legt nahe, dass Epitopsequenz und Resistenzmarker keinen Einfluss auf die MatK-Funktion haben.

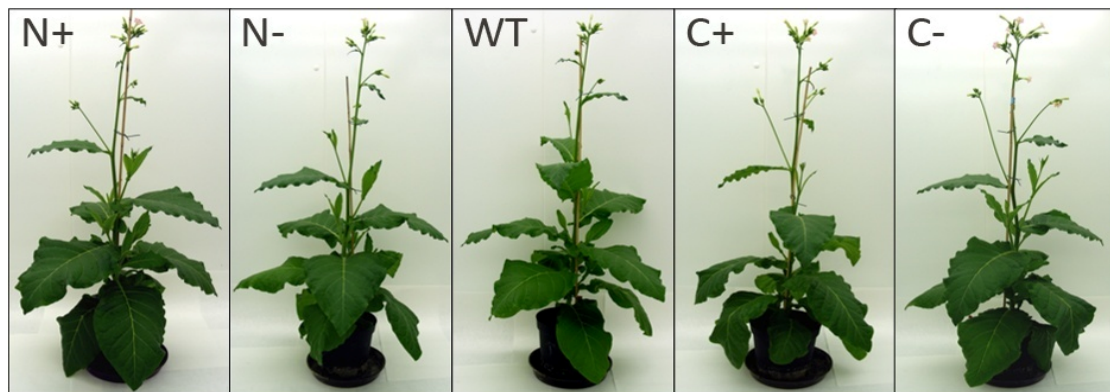


Abb. 9: Auf Erde gezogene, homoplastomische Pflanzen zeigen keine phänotypischen Unterschiede im Vergleich zu WT-Pflanzen (Abkürzungen wie in Abb. 7).

3.1.4 MatK ist ein Stromaprotein

Plastidäre Spleißfaktoren sind im Allgemeinen im Stroma lokalisiert (Übersicht in Kroeger et al., 2009). Dementgegen wurde über eine Membranassoziation von MatK spekuliert (Barthet und Hilu, 2007a). Um zu prüfen, inwieweit MatK als potentieller Spleißfaktor membranassoziiert oder als lösliches Protein vorliegt, wurden Western-Analysen mit einem HA-spezifischen Antikörper (Sigma) auf den entsprechenden chloroplastidären Fraktionen ausgeführt (s. Abb. 10).

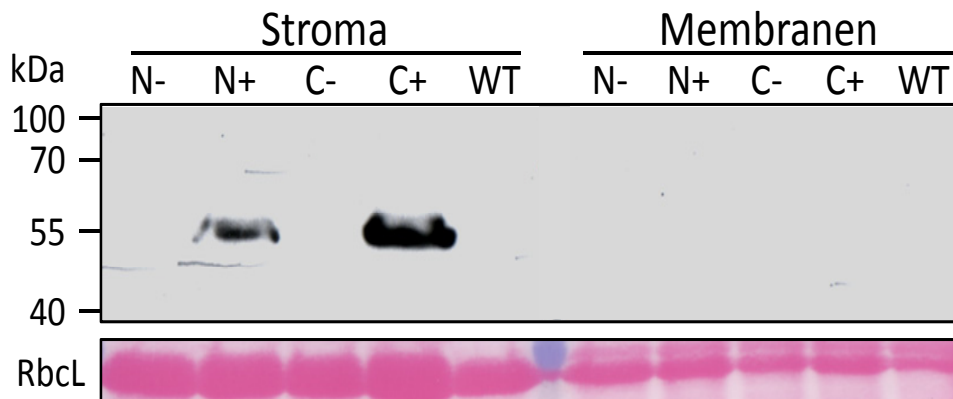


Abb. 10: Immunologische Detektion des HA-epitopmarkierten MatK-Proteins in der löslichen Fraktion chloroplastidärer Extrakte. Chloroplasten aus 7 d alten transplastomischen bzw. WT-Pflanzen wurden lysiert und in Membran- und Stromabestandteile separiert. Der Proteingehalt der Fraktionen wurde quantifiziert, gleiche Mengen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und für die Western-Analyse mit dem HA-Antikörper (Sigma) eingesetzt. Die Analyse wurde einmal mit gleichem Ergebnis wiederholt. kDa = Kilo-dalton, RbcL = große Untereinheit der RuBisCO (~ 55 kDa, detektiert durch Ponceaufärbung), übrige Abkürzungen wie in Abb. 7.

Separation von Chloroplastenisolationen in Stroma- und Membranfraktionen und anschließende Western-Analyse mit dem HA-Antikörper zeigten spezifische Signale ausschließlich in der löslichen Fraktion der transplastomischen Linien mit epitopmarkiertem MatK (N+, C+, s. Abb. 10). Das MatK-spezifische Signal ist mit ca. 55 kDa kleiner als die mit rund 64 kDa berechnete Größe des epitopmarkierten Proteins. Allerdings ist bekannt, dass RNA-Bindeproteine im Allgemeinen und MatK im Speziellen in der SDS-PAGE schneller migrieren als es ihre Größe erwarten lässt (z.B. Barthet und Hilu, 2007b; Liere und Link, 1995).

3.1.5 MatK wird speziell in jungen, grünen Organen exprimiert

Aufgrund des Fehlens qualitativ hochwertiger MatK-Antikörper sind keine quantitativen Daten zur entwicklungs- oder organabhängigen MatK-Expression verfügbar. Eine qualitative Western-Analyse in Reis mit geringer zeitlicher Auflösung lässt eine stärkere Expression in frühen Entwicklungsstufen lediglich vermuten (Barthet und Hilu, 2007b). Daher wurde in der vorliegenden Arbeit die entwicklungsabhängige Expression des epitopmarkierten MatK-Proteins durch quantitative Western-Blot-Analyse verschiedener Organe unterschiedlichen Alters untersucht (s. Abb. 11).

Die stärkste MatK-Akkumulation wurde sieben Tage nach Aussaat beobachtet. Ein zweiter Gipfel der MatK-Expression ist in 18 Tage alten Pflanzen bestimmt worden. In den, dem Alter nach intermediären, elf Tage alten Pflanzen sinkt die MatK-Proteinmenge auf weniger als die Hälfte des Maximalwertes ab. In älteren Pflanzen (> 18 Tage) verringern sich die gemessenen Mengen des MatK-Proteins beständig. 38 Tage nach der Aussaat ist MatK kaum noch detektierbar, in ausgewachsenen Blättern 59 Tage alter Pflanzen, die keine sichtbaren Anzeichen von Seneszenz zeigen, ist MatK nicht nachweisbar. Demgegenüber ist das epitopmarkierte Protein in den Achselknospen älterer Pflanzen gut nachweisbar, wobei die Expressionslevels sogar mit zunehmendem Alter der Pflanze ansteigen. In Wurzeln und Blüten von Pflanzen verschiedener Altersstufen fanden sich keine nachweisbaren Mengen des MatK-Proteins (Daten nicht gezeigt). In den Stengeln verschieden alter Pflanzen akkumuliert MatK nur sehr schwach (Daten nicht gezeigt). Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass MatK speziell in jungen, grünen Geweben exprimiert wird, was eine Funktion bei der Chloroplastenbiogenese vermuten lässt.

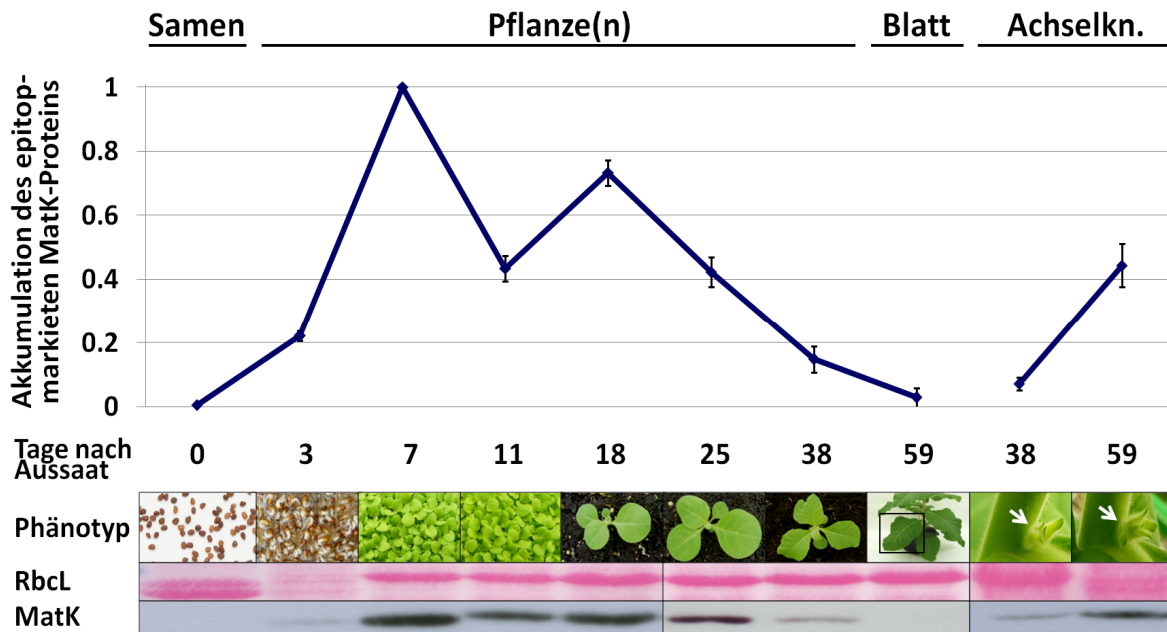


Abb. 11: Entwicklungsabhängige MatK-Expression. Gleiche Mengen löslichen Gesamtproteins aus Samen sowie Pflanzen, Blättern und Achselknospen (Achselkn.) unterschiedlichen Alters der transplastomischen Linien mit epitopmarkiertem MatK (N+, C+) wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembranen transferiert und für die Western-Analyse mit dem HA-Antikörper (Sigma) eingesetzt. Chemolumineszenzsignale von drei Western-Analysen (zwei biologische Replikate) wurden mit dem Lumi-Imager (Roche) detektiert, quantifiziert (Quantity-One-Software, Bio-Rad), jeweils auf den Maximalwert normiert (7 d alte Pflanzen) und gegen das Alter der Pflanzen aufgetragen (oben). Standardabweichungen sind als vertikale Linien dargestellt. Phänotypen von Pflanzen oder Pflanzenteilen und repräsentative Ausschnitte der Ponceaufärbung (RbcL in grünen Geweben) sowie der Chemoluminogramme sind gezeigt (unten). Irrelevante Spuren wurden entfernt (senkrechte Linien).

3.1.6 Epitopbasierte MatK-Immunopräzipitation

Für die Identifikation MatK-assoziiierter RNAs musste eine epitopbasierte Immunopräzipitation des Proteins etabliert werden. Es wurden Test-Immunopräzipitationen auf Stromafraktionen sieben Tage alter transplastomischer Pflanzen mit dem HA-spezifischen Antikörper (Sigma) ausgeführt. Die anschließende Western-Analyse der präzipitierten Pellet- sowie der freien Überstandsfraktionen mit einem Peroxidase-gekoppelten HA-Antikörper (Sigma) zeigte, dass sich sowohl N- als auch C-terminal epitopmarkiertes MatK mit Hilfe des HA-Antikörpers aus plastidären Stromaextrakten präzipitieren lässt (s. Abb. 12). Dies ermöglicht die Identifikation MatK-assoziiierter RNAs durch Analyse von Protein-Nukleinsäure-Copräzipitaten (s. Kap. 3.1.7).

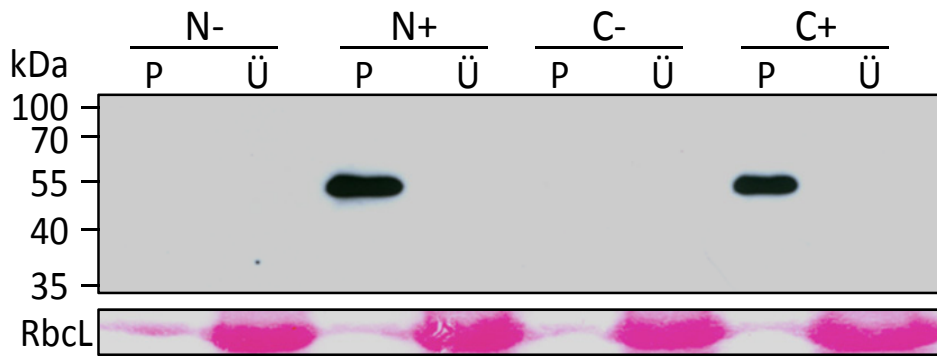


Abb. 12: Immunologische Analyse von epitopbasierten MatK-Immunopräzipitationen aus transplastomischen Pflanzen. Pellet- und Überstandsanteile (1 : 1) aus Immunopräzipitationen mit dem HA-Antikörper (Sigma) auf Stromafraktionen transplastomischer Pflanzen (7 d alt) wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und für die Western-Analyse mit einem Peroxidase-gekoppelten HA-Antikörper (Sigma) verwendet. Ein Ausschnitt der Ponceaufärbung ist gezeigt (RbcL). Die Analyse wurde mehrmals mit gleichem Ergebnis wiederholt. P = Pellet, Ü = Überstand, andere Abkürzungen s. Abb. 10.

3.1.7 Spezifische MatK-Assoziation mit sieben Gruppe-IIA-Introns

Zur Identifikation MatK-assoziiierter RNAs wurden Immunopräzipitationen auf den Stromafraktionen der transplastomischen Tabaklinien N+, N-, C+, C- ausgeführt. Copräzipitierte und freie RNA wurden differentiell mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert (Cy5 und Cy3), kompetitiv auf einen Tabak-Chloroplastengenom-*Tiling-Microarray* hybridisiert, detektiert und quantifiziert (RNA-Immunopräzipitation und Chip-Hybridisierung, RIP-Chip, Nakamura et al., 2003; Schmitz-Linneweber et al., 2005a). Der Quotient von gebundener zu ungebundener RNA wurde für epitopmarkierte (N+, C+) und Kontrolllinien (N-, C-) berechnet und ins Verhältnis gesetzt. Diese differentielle Anreicherung (+HA/-HA) wurde gegen die Genomposition der Sonden des *Arrays* aufgetragen (s. Abb. 13A). Sieben der acht am stärksten und signifikantesten angereicherten RNAs tragen Gruppe-IIA-Introns (p-Werte $< 5 \times 10^{-4}$, Wertetabelle in Zoschke et al., 2010). Darunter finden sich vier tRNAs (*trnK-UUU*, *trnV-UAC*, *trnI-GAU*, *trnA-UGC*), zwei Transkripte ribosomaler Proteine (*rpl2*, *rps12*) sowie das Transkript einer chloroplastidären ATPase-Untereinheit (*atpF*). Beim achten Transkript handelt es sich um die 23S-rRNA (*rrn23*), wobei deren differentielle Anreicherung eine geringe Signifikanz aufweist (p-Werte $\sim 0,04$). Hinzu kommt, dass 23S-rRNA, *trnI-GAU* und *trnA-UGC* auf einem polycistronischen Vorläufertranskript lokalisiert sind, so dass eine gewisse Anreicherung durch Copräzipitation mit *trnI*- und *-A*-Vorläufern wahrscheinlich ist.

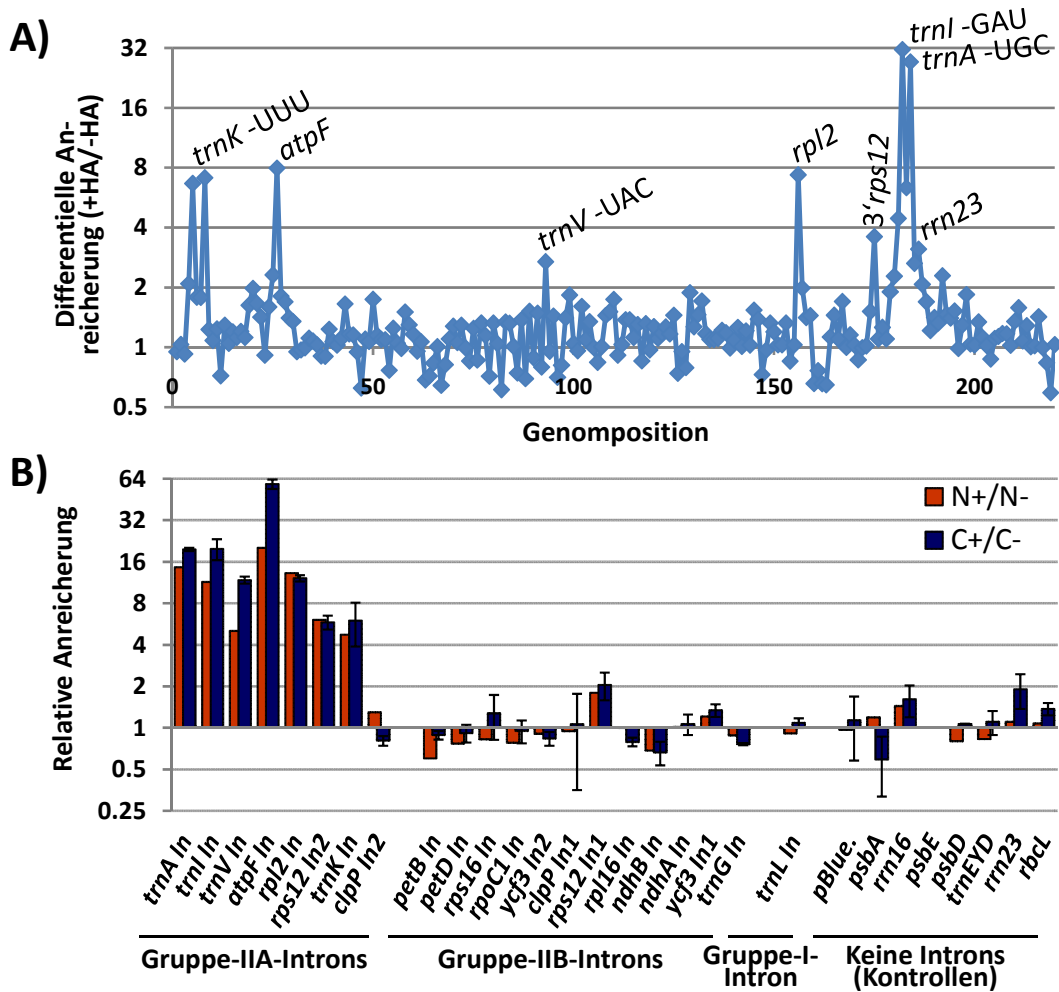


Abb. 13: Identifikation MatK-assoziiierter RNAs im Stroma der transplastomischen Pflanzen. A) MatK-assoziierte RNAs wurden durch epitopbasierte RNA-Coimmunopräzipitation und *Microarray*-Analyse identifiziert (RIP-Chip). Die Anreicherungs-werte ($F_{635} : F_{532} = \text{Pellet} : \text{Überstand}$) von 13 Experimenten wurden normalisiert ($3 \times N^+$, $3 \times N^-$, $4 \times C^+$, $3 \times C^-$). Die hintergrundbereinigten, Median-normalisierten Werte der Punktreplicate von Analysen mit epitopmarkierten Linien (N^+/C^+) wurden durch die von Analysen mit Kontrolllinien (N^-/C^-) dividiert und gegen die Genomposition der Sonden aufgetragen (+HA/-HA). Die Skalierung der Y-Achse ist logarithmisch. Eine Wertetabelle ist bei Zoschke et al. (2010) gezeigt. B) Validierung der RIP-Chip-Ergebnisse durch radioaktive Markierung und *Macroarray*-Hybridisierung. Coimmunopräzipitierte RNA aus epitopmarkierten (N^+/C^+) und Kontrolllinien (N^-/C^-) wurde mit Zufalls-*Primern* unter Einbau radioaktiv markierter Desoxynukleotide revers transkribiert und (als cDNA) auf *Macroarrays* hybridisiert. Die Signale wurden detektiert, quantifiziert (Phosphorimager/Quantity-One-Software, Bio-Rad) und jeweils auf das *psbE*-Signal normalisiert (Normalisierungen auf *psbA*, *psbD*, *rrn16* und *rrn23* ergaben vergleichbare Ergebnisse). Die Werte eines (N^+)-Experimentes bzw. zweier (C^+)-Replikate wurden zu denen eines (N^-)-Experimentes bzw. zweier (C^-)-Replikate ins Verhältnis gesetzt. Die Y-Achse ist logarithmisch skaliert. Standardabweichungen = vertikale Balken, In = Intron, pBlue. = pBluescript II SK (+).

Zur Bestätigung der RIP-Chip-Ergebnisse wurde in einer alternativen Methode coimmunopräzipitierte RNA aus den transplastomischen Tabaklinien N+, N-, C+, C- mit Zufalls-*Primern* und unter Einbau von radioaktiv markierten Desoxynukleotiden revers in cDNA transkribiert, die auf *Macroarrays* hybridisiert wurde. Diese *Arrays* enthielten Sonden für alle plastidären Introns sowie verschiedene Kontrollsonden, einschließlich einer 23S-rRNA-Sonde. Die Signale eines (N+/N-)-Experimentpaares und zweier (C+/C-)-Experimentepaare wurden quantifiziert, normalisiert und für die Berechnung relativer Anreicherungs-werte (+HA/-HA) herangezogen (s. Abb. 13B). Eine Anreicherung wird lediglich für jene sieben Transkripte mit Gruppe-IIA-Introns deutlich, die bereits in der RIP-Chip-Analyse identifiziert wurden. Weder eines der anderen Introns, noch eine der RNAs, die wie *rrn23* ebenfalls geringe Anreicherungen im RIP-Chip zeigten, wurden in Immunpräzipitationen mit epitopmarkiertem MatK copräzipitiert und angereichert.

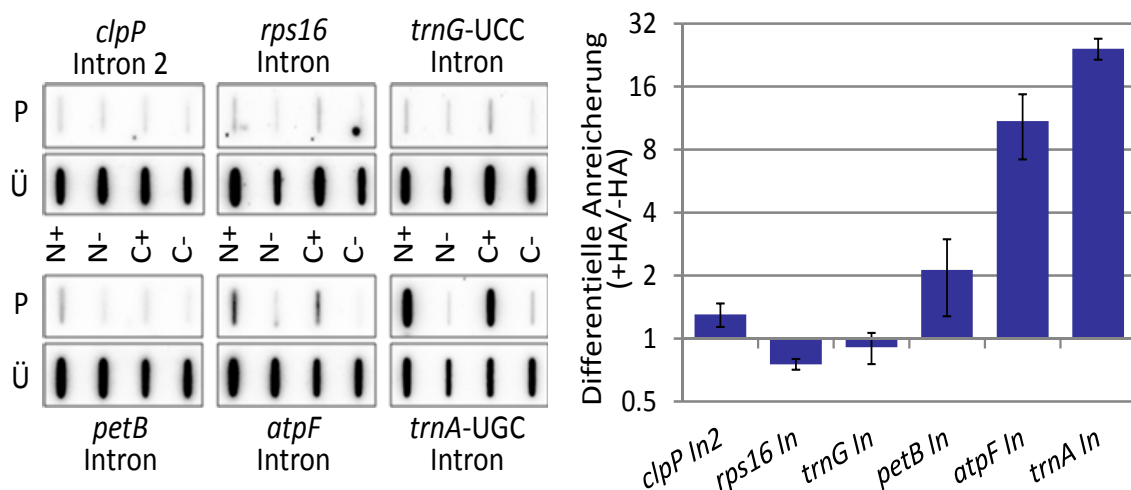


Abb. 14: *Slot-Blot*-Hybridisierung coimmunopräzipitiierter RNA mit Intronsonden zur Validierung der RIP-Chip-Ergebnisse. Links: Ein Drittel der RNA aus Pelletfraktionen (P) und ein Zehntel der RNA aus Überstandsfractionen (Ü) aus Immunpräzipitationen der Tabaklinien N+, N-, C+, C- wurden auf Nylonmembranen transferiert und mit Intronsonden hybridisiert. Rechts: Die Signale wurden detektiert und quantifiziert (Phosphorimager/Quantity-One-Software, Bio-Rad), Quotienten aus Pellet und Überstandssignalen wurden berechnet, zwischen epitopmarkierten und Kontrolllinien ins Verhältnis gesetzt und zusammengefasst (Mittelwert aus N+/N- und C+/C- = differentielle Anreicherung +HA/-HA). Vertikale Linien zeigen Standardabweichungen. Die Skalierung der Y-Achse ist logarithmisch.

Das einzige Gruppe-IIA-Intron, das mit keiner Methode als MatK-assoziiert detektiert wurde, ist das zweite Intron in *clpP*. Um dieses Resultat weiter abzusichern, wurden in

Slot-Blot-Analysen coimmunopräzipitierte und freie RNAs auf Membranen fixiert und mit verschiedenen Intronsonden hybridisiert (s. Abb. 14). Die Signale wurden quantifiziert und die Quotienten aus Pellet- und Überstandssignalen aus Experimenten mit epitopmarkierten Linien zu denen aus Experimenten mit Kontrolllinien ins Verhältnis gesetzt (+HA/-HA). Während sich für die Gruppe-IIA-Introns der *trnA*- und *atpF*-Transkripte eine deutliche Anreicherung zeigt, sind für die Gruppe-IIB-Introns der *trnG*-, *petB*- und *rps16*-Transkripte sowie für das Gruppe-IIA-Intron enthaltende *clpP*-Transkript keine Copräzipitationen zu beobachten.

3.1.8 MatK-Assoziation mit verschiedenen *trnK*-Introndomänen

Um die MatK-Bindestelle(n) in seinem Heimatintron durch RIP-Chip-Analyse genauer charakterisieren zu können, wurden *Tiling-Arrays* verwendet, die das *trnK*-Gen (Tabak) mit Oligonukleotiden abdecken (Zoschke et al., 2010). Diese teilweise überlappenden Oligonukleotidsonden sind, von drei Ausnahmen abgesehen, 50 nt lang (Zoschke et al., 2010). In vergleichbaren Experimenten wurden durch *Slot-Blot*-Analysen mit Oligonukleotidsonden die Bindestellen plastidärer PPR-Proteine bestimmt (Pfalz et al., 2009; Schmitz-Linneweber et al., 2006). Die Methode beruht auf der Protektion von RNA-Bereichen durch das RNA-Bindeprotein vor intrinsischen RNasen, die während der Stromaextraktion und der Immunopräzipitation aktiv sind. Das Ausmaß der Degradation und damit die Möglichkeiten der Auflösung der Bindestelle(n) wurden durch Northern-Analysen mit einer *trnK*-Intron-spezifischen Sonde bestätigt (s. Abb. 15C). RNA aus Überstandsfractionen von Immunopräzipitationen zeigt den Hauptteil degradiertes *trnK*-Vorläuferfragmente im Größenbereich zwischen ~ 100 nt und ~ 500 nt, wobei keine intakten *trnK*-Vorläufertranskripte detektiert wurden, die hingegen in Gesamt-RNA-Isolationen nachweisbar sind (RNase-Inhibition durch phenolische Extraktion). In den Pelletfraktionen liegt die Menge der präzipitierten RNA unter der Nachweisgrenze (was beim Vergleich der Signalfäche der Northern- und RIP-Analyse nicht unerwartet ist). Dennoch ist ein vergleichbarer Abbau auch für die Pelletfraktionen anzunehmen, so dass eine Auflösung der MatK-Bindestelle(n) möglich ist.

Die Sekundärstruktur des *trnK*-Introns zeigt die für Gruppe-II-Introns charakteristischen sechs Domänen, die von einem zentralen Rad ausstrahlen (DI - VI, s. Kap. 1.2.1). Die Position der Oligonukleotidsonden in diesen Domänen ist in Abb. 15A dargestellt (eine

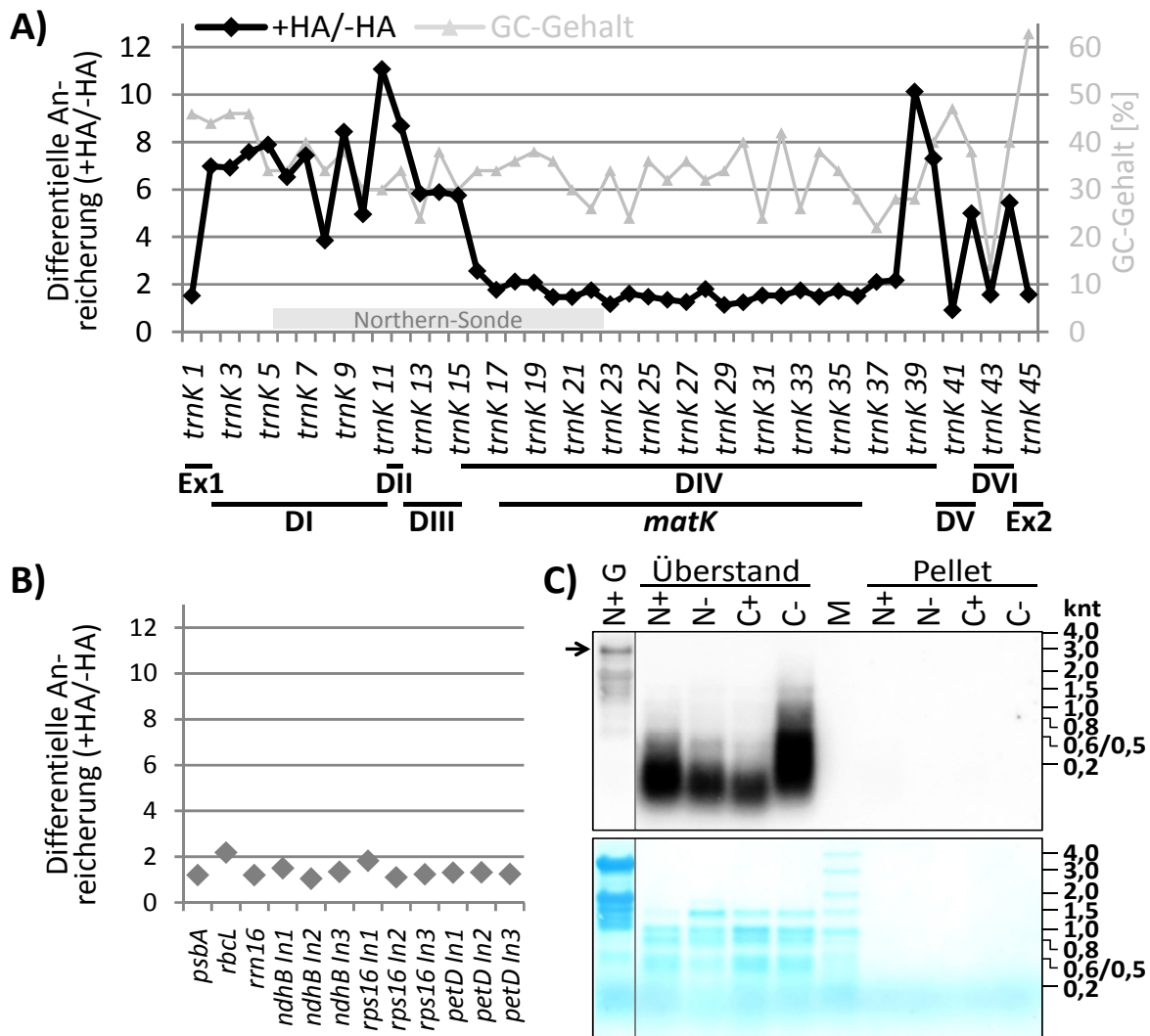


Abb. 15: Kartierung der MatK-Bindestellen im *trnK*-Vorläufertranskript. A) MatK-assoziierte Fragmente des *trnK*-Vorläufers wurden durch epitopbasierte RIP-Chip-Analyse identifiziert (s. Abb. 13, 3 Experimente je transplastomischer Tabaklinie: N+, N-, C+, C-). Eine Wertetabelle ist bei Zoschke et al. (2010) gezeigt. Die Lage der RIP-Chip-Sonden und einer Northern-Sonde (s. C) in Intronen und Exons ist gezeigt (DI - DVI, Ex1/Ex2). Der GC-Gehalt der Sonden ist indiziert. B) Anreicherungsgrade von Kontrollsonden aus Genen, die nicht als MatK-assoziiert identifiziert wurden (+HA/-HA, basierend auf den in A gezeigten Experimenten, In = Intron). C) Northern-Analyse MatK-coprecipitierter RNA. Oben: Die Hälfte der RNA aus Pellet- und ein Drittel der RNA aus Überstandsfraktionen aus epitopbasierten MatK-Immunopräzipitationen mit transplastomischen Tabaklinien (N+, N-, C+, C-) sowie 10 µg Gesamt-RNA (G) aus einer (N+)-Linie wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt (1,5 % Agarose), auf eine Nylonmembran transferiert und mit einer *trnK*-Intron-Sonde hybridisiert (Position s. A, Sonden-Primer s. Tab. 4, S. 121). Irrelevante Spuren sind entfernt worden (senkrechte Linien). Unten: Methylblau-Färbung (zytoplasmatische ribosomale Banden der Gesamt-RNA fehlen in Immunpräzipitationen mit Plastidenmaterial). Die Analyse wurde einmal mit gleichem Ergebnis wiederholt.

genauere Position in Subdomänen und Elementen der Tertiärstruktur ist bei Zoschke et al. (2010) gezeigt). Als Kontrollen befinden sich zwölf Oligonukleotide aus den Genen *rrn16*, *rbcL*, *psbA* sowie den Gruppe-IIB-Introns der Gene *rpl16* und *petD* auf den *Microarrays*. Die entsprechenden Transkripte wurden in den primären RIP-Chip-Experimenten nicht als MatK-assoziiert identifiziert (s. Abb. 13). RIP-Chip-Analysen mit *trnK*-Oligonukleotid-*Tiling-Arrays* wurden basierend auf Immunopräzipitationen mit epitopmarkierten und Kontrolllinien ausgeführt (3 Experimente je Genotyp). Die differentielle Anreicherung (+HA/-HA, s. Kap. 3.1.7) wurde berechnet und gegen die Position der Oligonukleotidsonden aufgetragen (s. Abb. 15A). Alle Kontrollsonden zeigen nur äußerst geringe Anreicherungswerte, die als Standard für eine passive Hintergrundanreicherung dienen (*rbcL* = 2,2; sonstige Werte $\leq 1,8$; s. Abb. 15B). Im Vergleich zu den Kontrollen ergibt sich keine Anreicherung für den gesamten *matK*-ORF, Domäne V, Teile von Domäne VI und die Exonsequenzen. Alle anderen Intronbereiche sind stark bis sehr stark angereichert (über dem Level der Kontrollen). Die größten Werte erreichen *trnK* 11/12 bzw. *trnK* 39, die mit Domäne I/II bzw. dem 3'-Ende von Domäne IV paaren. Die Anreicherung ist keine Funktion des GC-Gehaltes der Sonden und damit unabhängig von Markierungs- oder Hybridisierungseffizienzen (s. Abb. 15A). Zusammenfassend legen diese Ergebnisse eine zeitlich oder räumlich multiple Assoziation von MatK mit den *trnK*-Introndomänen I, II, III, dem 3'-Ende der Domäne IV und Teilen von Domäne VI während des Spleißprozesses nahe.

3.1.9 Untersuchungen zur Regulation der MatK-Expression

Für eine der am besten untersuchten Maturasen, das LtrA-Protein aus *Lactococcus lactis*, wurde ein Autoregulationsmechanismus nachgewiesen, bei dem die Bindung des Proteins an eine kleine, das Startcodon enthaltende Stammschleife (DIVa) seiner mRNA die Translation inhibiert und eine adäquate Expression sicherstellt (s. Abb. 16 und Kap. 1.2.8). Auch die MatK-Startcodons in Mais und Tabak befinden sich in vorhergesagten Stammschleifen, die eine ähnliche Funktion der Regulation vermuten lassen (s. Abb. 16). Der Nachweis der Autoregulation von LtrA wurde im heterologen Expressionssystem in *E. coli* erbracht (Singh et al., 2002). Dasselbe Expressionssystem ist in der vorliegenden Arbeit genutzt worden, um eine mögliche Autoregulation für das MatK-Protein aus Mais zu testen (Zoschke et al., 2009).

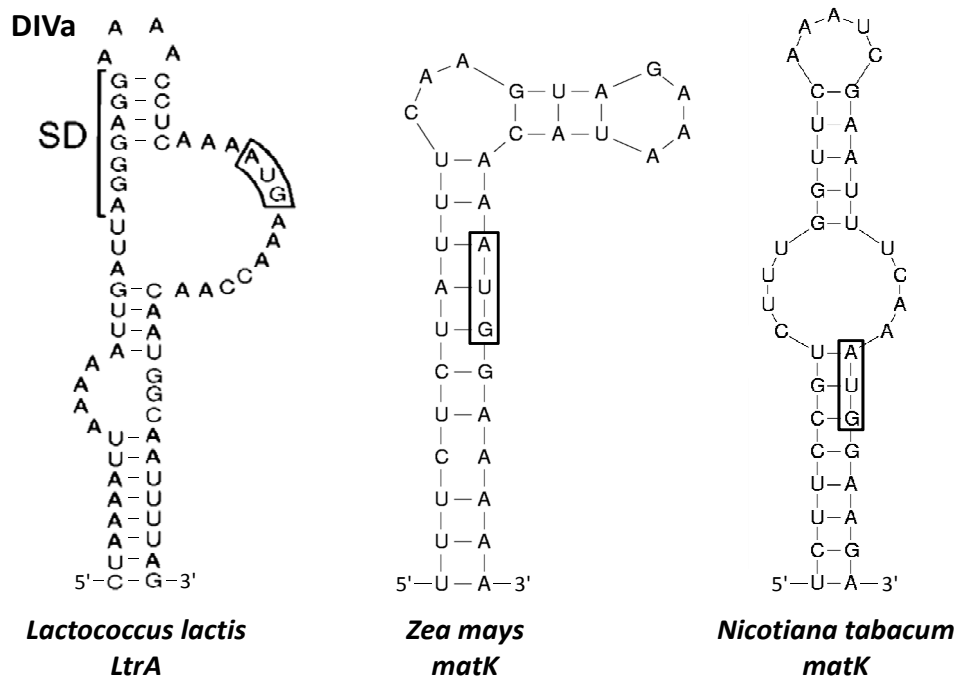


Abb. 16: Stammschleifenstrukturen der Introndomäne IV in der Umgebung des Startcodons von Maturasen. Links: DIVa der *LtrA*-mRNA aus *Lactococcus lactis* enthält die Shine-Dalgarno-Sequenz (SD) sowie das Startcodon (eingerahmt) der Maturase und ist die Hauptbindestelle des Proteins (verändert nach Singh et al., 2002). Die Bindung der Maturase an diese Stammschleife unterbindet die Translation und autoreguliert die Expression von *LtrA*. Mitte und Rechts: Vorhergesagte Stammschleifen in der Umgebung der *matK*-Startcodons von Mais und Tabak (Mfold, Mathews et al., 1999; Zuker, 2003). Die Startcodons sind eingerahmt. *matK* besitzt keine kanonische Shine-Dalgarno-Sequenz. D = Domäne.

Drei Regionen aus *Zea mays*, die das *matK*-Startcodon enthalten, wurden so mit dem *lacZ*-Gen eines Reportervektors fusioniert (pACYC184), dass dessen endogenes Startcodon deletiert ist (s. Abb. 17, Singh et al., 2002; Zoschke et al., 2009). Die *lacZ*-Reporterexpression wird durch einen Arabinose-induzierbaren Promotor realisiert. Die so klonierten Reporter-gen-Vektoren *pmZ1*, -2 und -3 beinhalten *matK-lacZ*-Fusionen, deren 3'-Ende 259 bp stromabwärts des Startcodons von *matK* liegt (+1 = erste Base des Startcodons). Die 5'-Enden der Insertionen variieren wie folgt: *pmZ1* beginnt direkt mit dem Startcodon, so dass die potentielle Stammschleife aufgelöst ist, *pmZ2* und *pmZ3* beginnen 132 bp und 239 bp vor dem Startcodon. Es ist bekannt, dass das *E. coli*-Translationssystem auch mRNA-Sequenzen ohne 5'-UTR translatiert und Mutationen in regulativen Sequenzen, wie der Shine-Dalgarno-Sequenz, toleriert (Barrick et al., 1994; Van Etten und Janssen, 1998). Dementsprechend erzeugten alle drei Vektoren

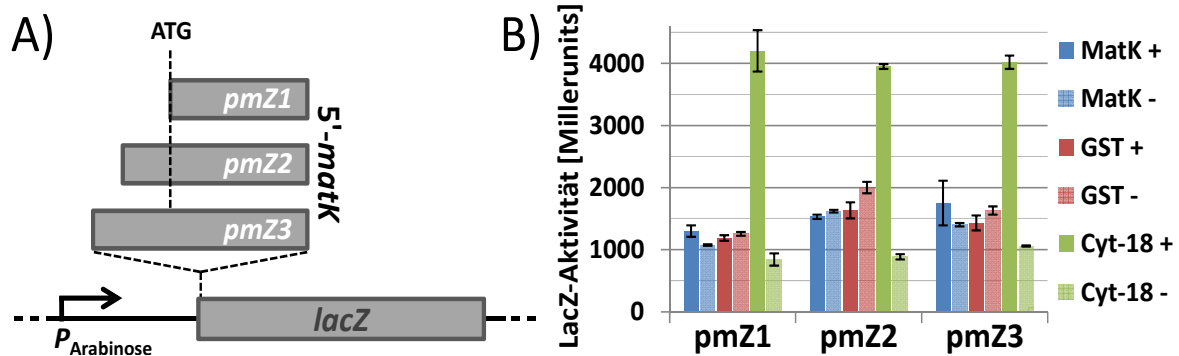


Abb. 17: Analyse zur Regulation der MatK-Expression im heterologen System. A) Schematischer Kartenausschnitt der 5'-matK-lacZ-Reporter-gen-Vektoren (pmZ1 - 3), die dem Test der Interaktion von MatK mit seiner mRNA dienen (nicht maßstabsgetreu). Das lacZ-Startcodon ist durch drei 5'-matK-Insertionen aus Mais (pmZ1 - 3) unter Beibehaltung des Leserahmens ausgetauscht. ATG = matK-Startcodon. P = Arabinose-induzierbarer Promotor vor lacZ. B) Quantitative Analyse der β -Galactosidase-Aktivität von 5'-matK-lacZ-Fusionen in *E. coli*. Die β -Galactosidase-Aktivität der Arabinose-induzierten 5'-matK-lacZ-Reporter-gen-Vektoren pmZ1 - 3 (s. A), wurde nach Koexpression mit MatK (pmatM2pGEX), GST (leerer MatK-Expressionsvektor) und CYT-18 (*Neurospora crassa*, Kontrollplasmid pEX560) in *E. coli* bestimmt (Singh et al., 2002; Zoschke et al., 2009). Gezeigt sind die lacZ-Aktivitäten mit (+) und ohne (-) Koinduktion der Expressionsvektoren durch IPTG (in Millerunits, Miller (1972); Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten). Die Standardabweichungen sind durch vertikale Linien indiziert.

nach Transformation in *E. coli* und Kultivierung auf Arabinose-/X-Gal-haltigem Medium blaue Kolonien, was die erfolgreiche Expression des 5'-matK-lacZ-Fusionsreporters anzeigt (nicht gezeigt). Die Koexpression dieser Reporter-gen-Vektoren mit dem IPTG-induzierbaren MatK-Expressionsvektor pmatM2pGEX (N-terminale GST-Fusion) sollte eine Expressionsrepression des 5'-matK-lacZ-Fusionsreporters hervorrufen, sofern die Maturase an die matK-Insertionen der Fusionsreporter-mRNA bindet und die Translation inhibiert (Zoschke et al., 2009). Die kotransformierten *E.-coli*-Zellen wurden in LB-Medium kultiviert und mit Arabinose und verzögert mit IPTG induziert (Kontrollen ohne IPTG-Induktion). Als Kontrollen sind GST (leerer MatK-Expressionsvektor) sowie CYT-18, ein RNA-Bindeprotein aus *Neurospora crassa*, in unabhängigen Assays mit den drei matK-lacZ-Fusionsvektoren koexprimiert worden (Kittle et al., 1991; Zoschke et al., 2009). MatK- und GST-Expression wurden durch Westernblot-Analyse mit einem GST-Antikörper überprüft (Zoschke et al., 2009), die LacZ-Aktivität wurde nach Standardmethoden bestimmt (s. Abb. 17). Im Gegensatz zur LtrA-Maturase, deren Koexpression in einem analogen Versuchsansatz die Expression

eines Fusionsreporters reprimierte (Singh et al., 2002), wurde kein Effekt der MatK-Koexpression auf die Aktivität der *matK-lacZ*-Fusionsreporter beobachtet (s. Abb. 17). Ebenso zeigte die GST-Koexpression keinen Effekt. Erstaunlicherweise ist ein deutlich positiver Effekt der CYT-18-Koexpression auf die Expression der 5'-*matK-lacZ*-Fusionsreporter zu beobachten. CYT-18 fungiert als Gruppe-I-Intron-Spleißfaktor in *Neurospora crassa* und könnte durch unspezifische RNA-Bindung die Translation fördern (z.B. durch Auflösung von Sekundärstrukturen, Zoschke et al., 2009).

Da dieses Negativresultat einer möglichen Autoregulation der MatK-Expression im heterologen Expressionssystem *E. coli* erhalten wurde, kann es keinen endgültigen Beweis darstellen. Eine alternative *In-Planta*-Annäherung an einen denkbaren Autoregulationsmechanismus ist in Kap. 3.1.11 beschrieben.

3.1.10 Expression der MatK-Ziele

Eine vorstellbare Korrelation zwischen der Expression von *matK* und der seiner Ziele könnte auf eine regulative Funktion des MatK-abhängigen Spleißens hinweisen. Dabei wäre insbesondere ein möglicher Zusammenhang zwischen dem Spleißstatus der MatK-Ziele und dem MatK-Level von Interesse. Um dies zu analysieren, wurden quantitative Northern-Analysen mit Intron- und Exonsonden für die MatK-Ziele *trnK*-UUU, *trnV*-UAC, *trnI*-GAU, *trnA*-UGC, *rpl2*, *rps12* und *atpF* ausgeführt (s. Abb. 18). Daneben wurde, als Kontrolle, die Expression des Gruppe-IIB-Intron enthaltenden *trnG*-UCC-Gens geprüft, dessen RNA nicht mit MatK assoziiert ist (s. Abb. 18). Es wurden jeweils sukzessive Intron- und Exonsonden auf Filter hybridisiert, die gleiche Mengen Gesamt-RNA aus den Organen/Altersstufen enthielten, welche für die MatK-Expressionsanalyse verwendet wurden (Linien N+ und C+, s. Abb. 11, Kap. 3.1.5). Lediglich aus Samen konnten keine ausreichenden RNA-Mengen für die Northern-Analyse gewonnen werden. Die Signale wurden quantifiziert (Quantity-One-Software, BioRad) und entsprechend ihrer Größe und Spezifität für Intron- bzw. Exonsonden gruppiert (Gruppen: intronhaltige Vorläufer, Prozessierungs- und Spleißzwischenprodukte, freie Introns, Intron-Degradationsprodukte oder reife, gespleißte Transkripte). Da die Dynamik der quantifizierten Einzelsignale einer Gruppe im Altersverlauf und in den verschiedenen Organen jeweils nur marginale Unterschiede aufwies, wurden diese durch Addition zusammengefasst. Die zusammengefassten Werte wurden auf den

kumulativen Maximalwert normiert (wegen erhöhter Varianz wurden die Werte von Achselknospen für die Normierung ausgeschlossen). Die normierten Werte der biologischen Replikate (N+, C+) wurden durch Mittelwertbildung zusammengefasst und gegen das Alter der Pflanzen/Organe aufgetragen (s. Abb. 18). Die Intron-Degradations- bzw. Prozessierungs- und Spleißzwischenprodukte verhielten sich für alle Transkripte in ihrem Akkumulationsverhalten im Wesentlichen wie die entsprechenden freien Introns bzw. Vorläufer (aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht gezeigt). Die Methylenblau-Färbungen zeigen, dass in jungen Organen die ribosomalen RNAs der Plastiden nur sehr schwach exprimiert sind (3 Tage, Achselknospen 38 und 59 Tage).

Bei der Analyse der *trnK*-Expression fanden sich Signale für intronhaltige Vorläufer, die mit ~ 2800 nt und ~ 2950 nt wahrscheinlich monocistronischen Transkripten entsprechen (Sugita et al., 1985). Größere Signale könnten von Kotranskripten mit *psbA* oder *rps16* abstammen. Das Signal von ~ 2500 nt ist spezifisch für die Intronsonde und stellt wahrscheinlich das freie Intron dar. Die eindeutige Identifikation des freien Introns per Northern-Analyse ist schwierig, da *Lariat*-RNA anomale Migrationseigenschaften in RNA-Gelen aufweist (z.B. Grabowski et al., 1984; Ruskin et al., 1984). Daneben finden sich Intron-Degradationsprodukte mit Größen zwischen ~ 1800 und ~ 700 nt. Die Intron-Degradationsprodukte, bei denen es sich der Größe nach um Matrizen der *matK*-Translation handeln könnte (≥ 1500), zeigen das gleiche Akkumulationsverhalten wie kleinere Degradationsprodukte. Nach Hybridisierung mit der Exonsonde wurde die reife tRNA detektiert. Trotz der unterschiedlichen Integration der HA-Epitopsequenz am 5'- bzw. 3'-Ende der *matK*-Sequenz in den Pflanzen der Linien N+ bzw. C+ zeigten sich keine Unterschiede in Signalmuster oder -stärke der *trnK*-Northern-Analysen dieser Pflanzen. Dies zeigt, dass die Epitopsequenz keinen Einfluss auf das Spleißen oder die Prozessierung hat. Die reife *trnK* ist in nichtgrünen Entwicklungsstadien (3 Tage) nur in geringen Mengen nachweisbar und erreicht in jungen grünen Stadien (7 - 11 Tage) höhere Akkumulationswerte, die in 18 - 25 Tage alten Pflanzen kaum abnehmen. In 38 Tage alten Pflanzen zeigen sich wiederum höhere RNA-Level, in ausgewachsenen Blättern 59 Tage alter Pflanzen wird ein Maximum erreicht. In den Achselknospen akkumuliert die reife tRNA schwach, wobei die Levels zudem mit zunehmendem Alter der Pflanze abnehmen. Vorläufer und freies Intron sind in jungen Pflanzen (3 und 7 Tage) in geringen Mengen nachweisbar, akkumulieren dann im weiteren Verlauf der

Entwicklung und erreichen in 25 Tage alten Pflanzen ein Maximum. In älteren Pflanzen (38 und 59 Tage) sinken die Levels der Vorläufer und des freien Introns wiederum ab. In den Achselknospen der 38 Tage alten Pflanzen wurde eine starke Akkumulation von Vorläufern und freiem Intron detektiert, die in 59 Tage alten Pflanzen eine ausgeprägte Abnahme zeigt.

Das für *trnK* beschriebene Akkumulationsmuster zeigte sich für die intronhaltigen Vorläufer, die reifen Transkripte und, sofern detektierbar, auch für die freien Introns aller untersuchten tRNAs. Auch *trnG*, kein MatK-Ziel, zeigte dieses Akkumulationsverhalten während der Entwicklung und Alterung der Pflanze.

Für *trnV* wurden der erwartete monocistronische Vorläufer (~ 750 nt) und das reife Transkript (73 nt) nachgewiesen (Deno et al., 1982). Ein freies Intron ist nicht detektiert worden. Für *trnI* und *trnA*, die sich auf dem polycistronischen Transkript des rRNA-Operons befinden (Kössel et al., 1982), konnten zahlreiche intronhaltige Vorläufer detektiert werden (~ 7000 nt - ~ 800 nt), von denen die größeren polycistronisch sind. Die monocistronischen Vorläufer weisen jeweils eine Größe von ca. 800 nt auf. Spezifische Signale der Intronsonden fanden sich jeweils bei rund 600 nt und könnten die freien Introns repräsentieren. Die reifen tRNAs konnten im erwarteten Größenbereich detektiert werden. Für *trnG* wurden zwei monocistronische Vorläufer (~ 750 nt, ~ 900 nt) sowie die reife tRNA, aber kein freies Intron detektiert (Meng et al., 1991).

Die proteinkodierenden MatK-Ziele zeigten z.T. ein von den tRNA-Zielen abweichendes Expressionsverhalten während der Alterung. Für *rpl2*, das sich in einem Operon ribosomaler Proteine befindet (Tanaka et al., 1986), konnten verschiedene polycistronische Vorläufer (~ 3100 nt – ~ 2300 nt bzw. ~ 1900 nt), ein oder zwei monocistronische Vorläufer (~ 1600 nt bzw. ~ 1900 nt) und Zwischenprodukte ihrer Größe nach identifiziert werden. Letztere könnten Prozessierungszwischenstufen oder Spleißintermediate darstellen, wie sie von Kim und Hollingsworth (1993) für *atpF* beschrieben wurden. Ein spezifisches Signal der Intronsonde wurde bei rund 700 nt identifiziert und könnte das freie Intron zeigen. Daneben wurden putative Intron-Degradationsprodukte (~ 350, ~ 200 nt) und ein spezifisches Signal der Exon-Sonde identifiziert (~ 900 nt). Letzteres könnte das reife monocistronische *rpl2*-Transkript darstellen. *rpl2*-Vorläufer, freies Intron und reifes Transkript zeigen die gleiche Akkumulationsdynamik während der Alterung der Pflanze, die in etwa der der tRNA-Vorläufer entspricht aber bereits in

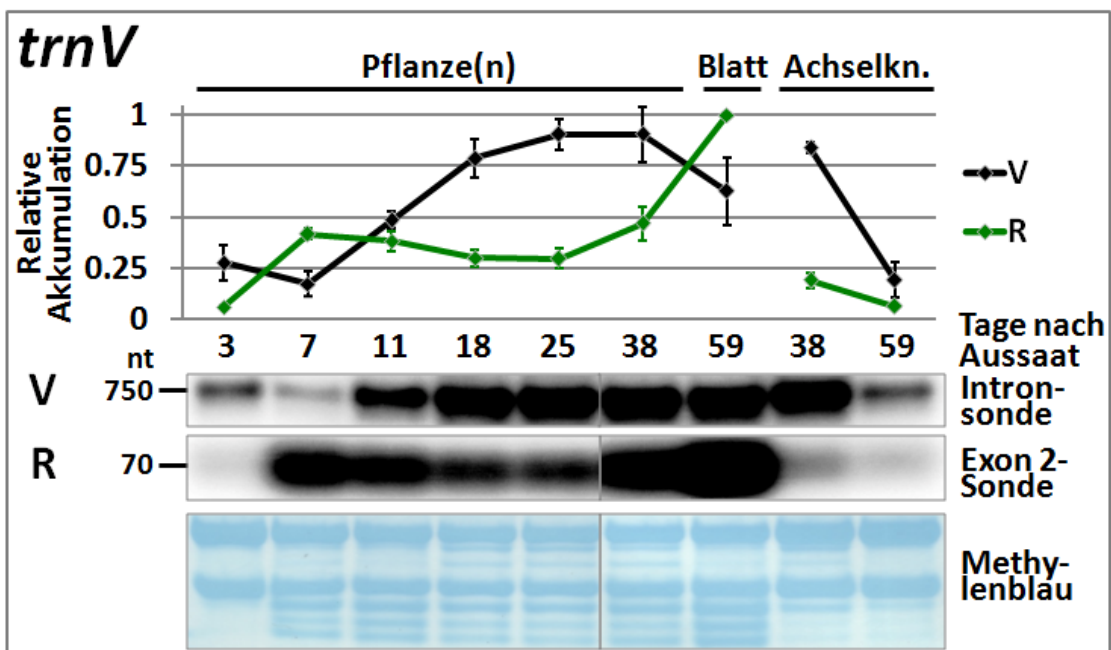
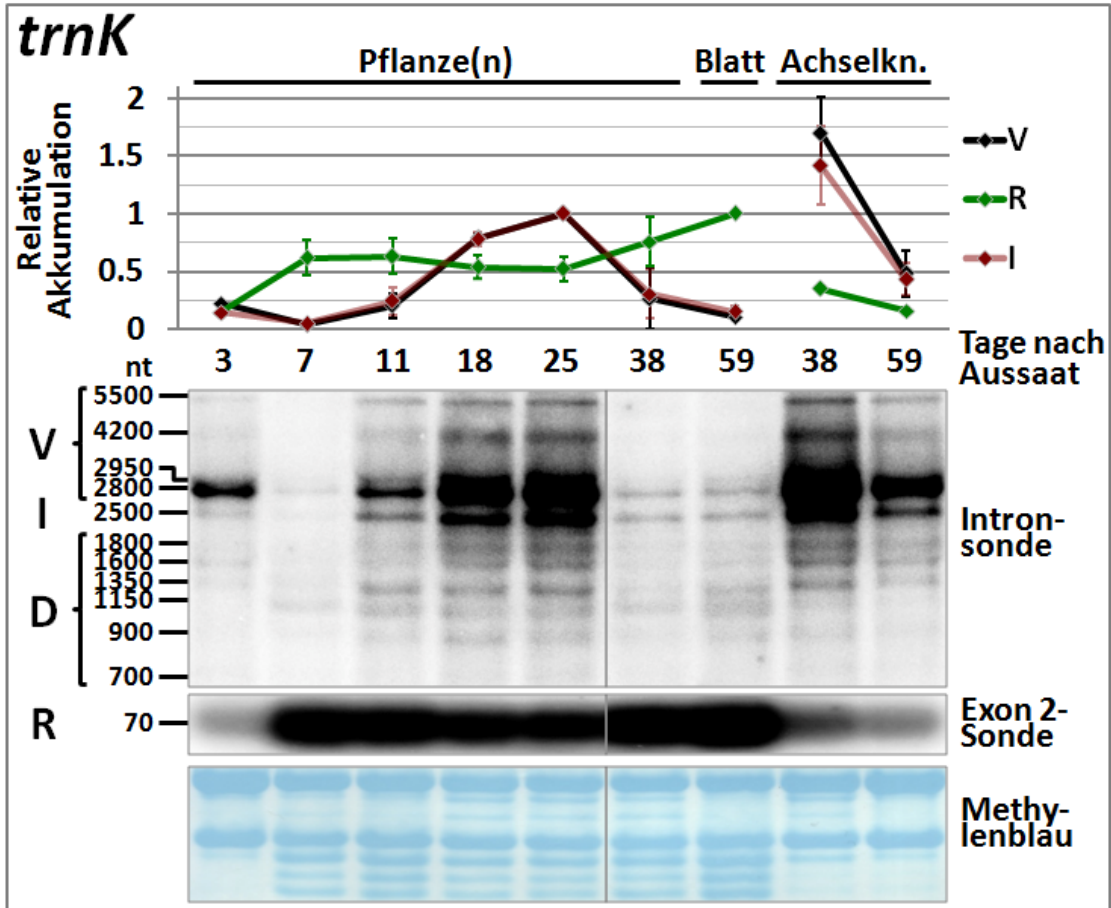
25 Tage alten Pflanzen ein Maximum aufweist. Eine sehr starke bzw. starke Akkumulation findet sich für alle drei *rpl2*-Abkömmlinge in den Achselknospen der 38 bzw. 59 Tage alten Pflanzen.

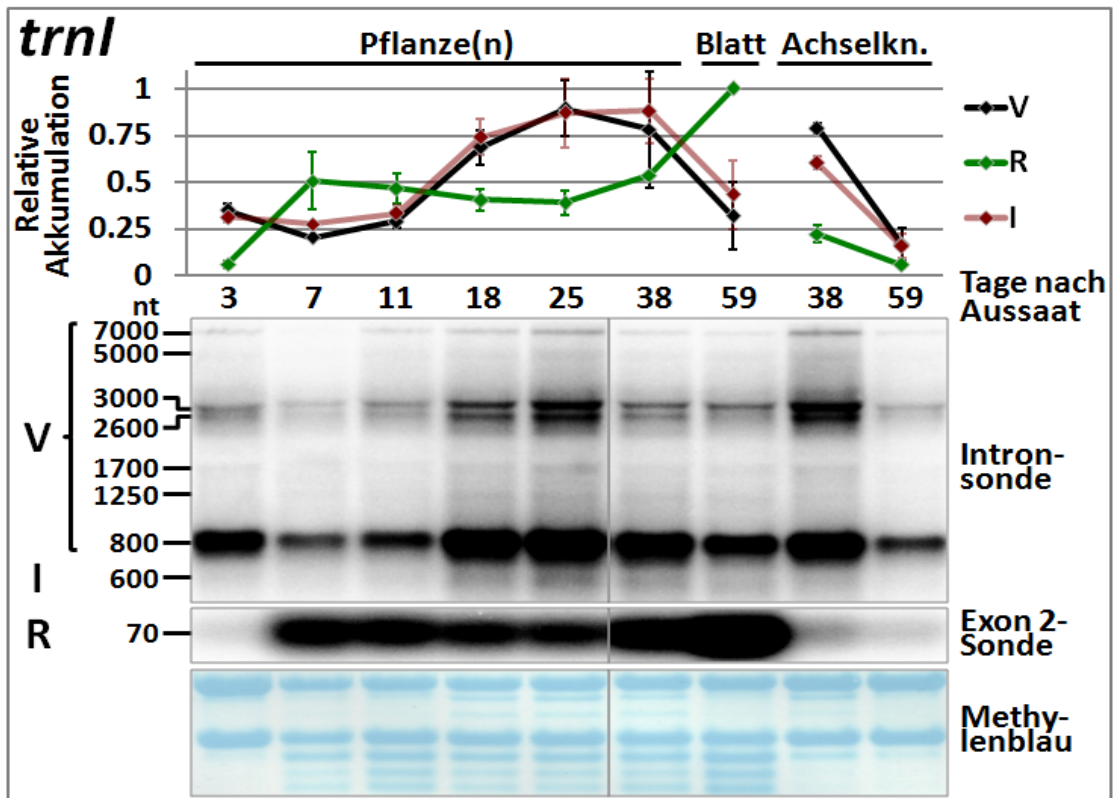
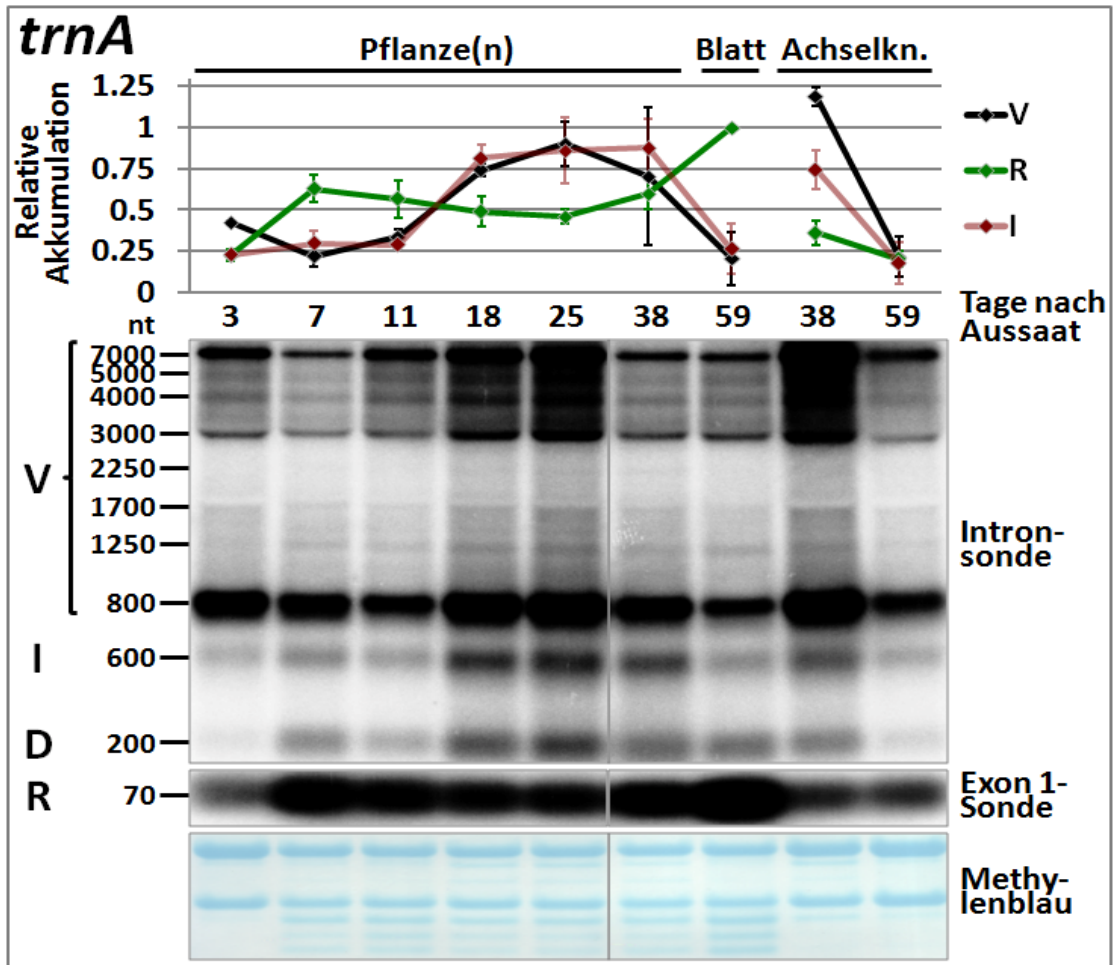
Auch die *rps12*-Vorläufer sowie die reifen, intronfreien Transkripte zeigen dieses Akkumulationsverhalten, wobei, wie bei den tRNAs, ein Maximum in 25 Tage alten Pflanzen erreicht wird und wiederum sehr starke bzw. starke Akkumulationen in den Achselknospen beobachtet wurden (38 bzw. 59 Tage). Das freie Intron hingegen akkumuliert, abgesehen von den ersten beiden Altersstufen, kontinuierlich über die gesamte Entwicklung der Pflanze und erreicht in den ältesten Pflanzen und Blättern ein Maximum, wobei in Achselknospen mit zunehmendem Alter abnehmende Levels beobachtet wurden. Das *cis*-Intron enthaltende 3'-Ende von *rps12* befindet sich ebenso wie das weit entfernt lokalisierte 5'-Ende in einem Operon (Überblick in Ems et al., 1995). Dementsprechend wurden zahlreiche das Gruppe-IIA-Intron enthaltende Vorläufer detektiert (~ 7000 nt - ~ 1000 nt), von denen die größeren und die kleinsten *in trans* gespleißt sein könnten. Signale von ~ 700 nt bzw. ~ 450 nt könnten ein Spleiß- oder Prozessierungszwischenprodukt bzw. ein Intron-Degradationsprodukt darstellen. Ein spezifisches Signal der Intronsonde wurde bei rund 550 nt identifiziert und könnte das freie Intron repräsentieren. Zwei spezifische Signale der Exon-2-Sonde (~ 2200 nt und ~ 1200 nt), könnten bicistronische, gespleißte Transkripte darstellen, erscheinen jedoch für ein Signal des monocistronischen reifen *rps12*-Transkripts zu groß.

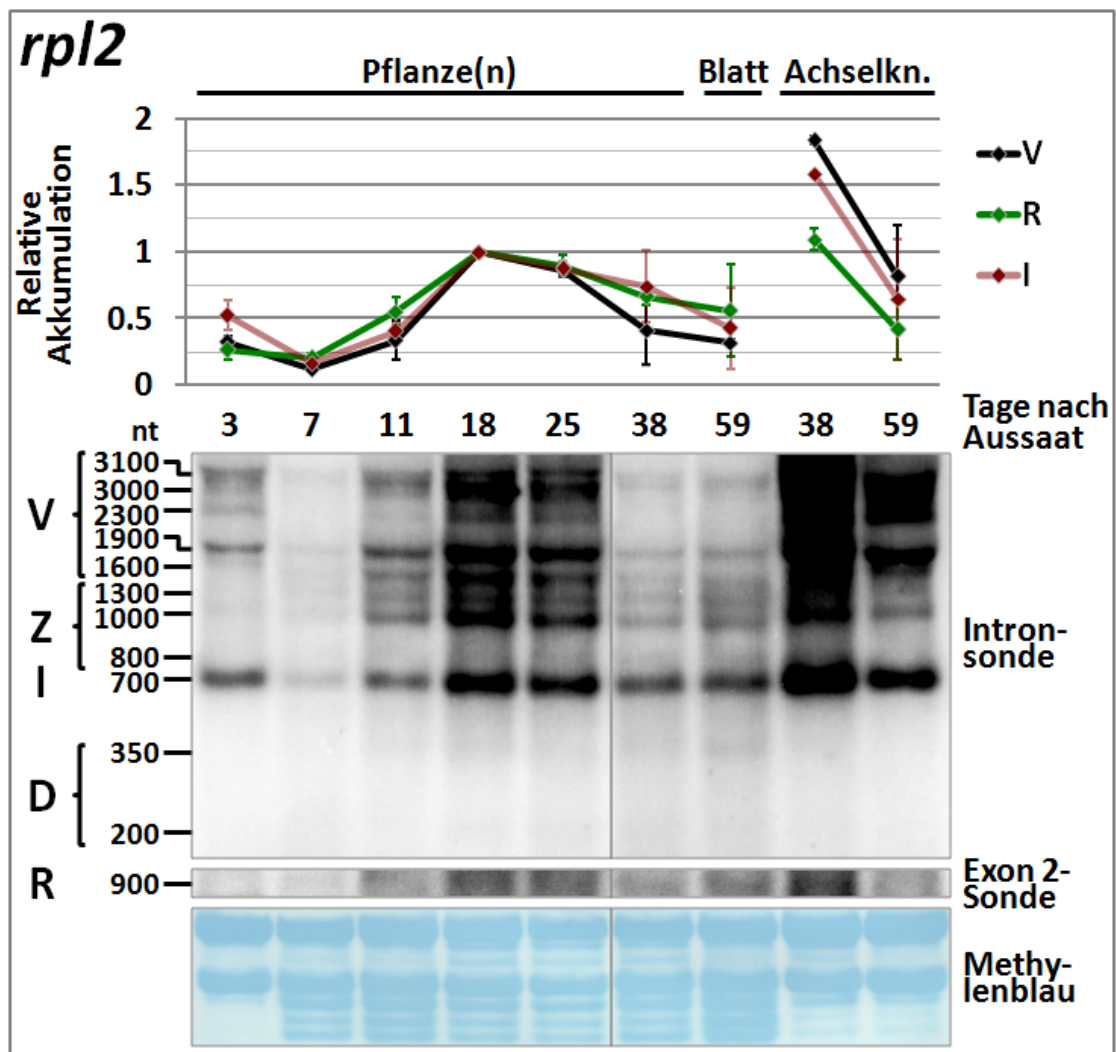
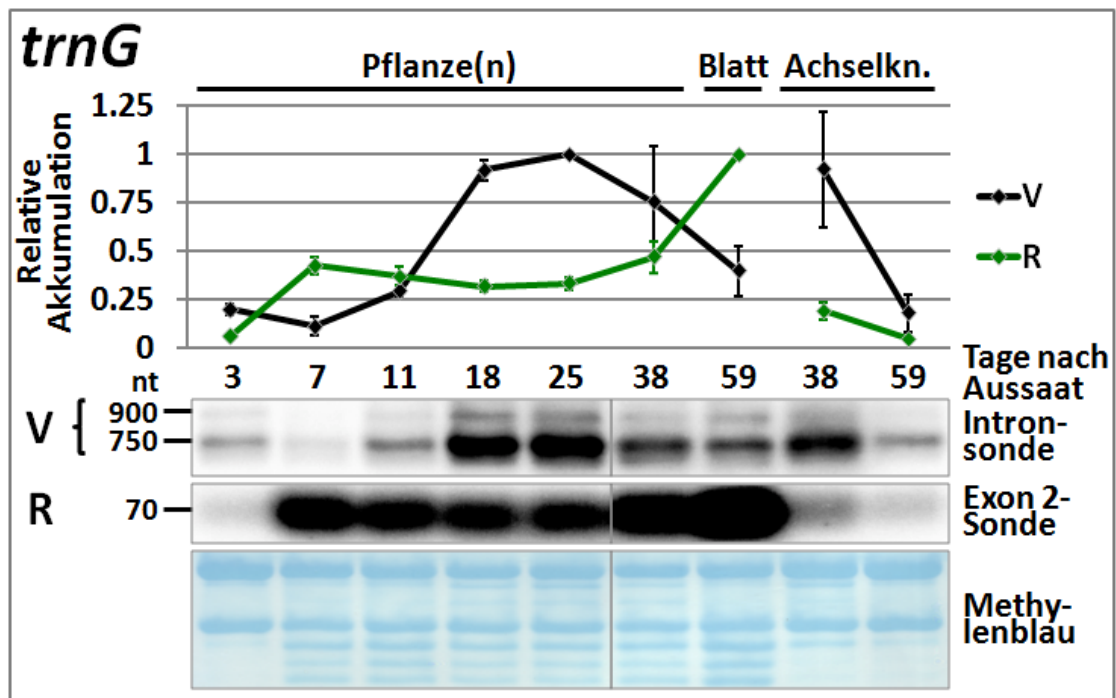
Das *atpF*-Gen befindet sich mit anderen *atp*-Genen und *rps2* in einem Operon (Miyagi et al., 1998). Infolgedessen finden sich in der Northern-Analyse zahlreiche Signale intronhaltiger Vorläufer (~ 5700 - ~ 1300 nt), von denen die großen poly- und das kleinste monocistronischen Ursprungs sein könnten. Daneben sind ein Spleiß-/Prozessierungszwischenprodukt (~ 900 nt) sowie ein spezifisches Signal der Intronsonde detektiert worden (~ 750 nt), das das freie Intron darstellen könnte (Kim und Hollingsworth, 1993). Die spezifischen Signale der Exon-2-Sonde könnten mit ~ 1400 bzw. ~ 800 nt das gespleißte bicistronische (mit *atpH*) bzw. monocistronische Transkript zeigen. Die reifen, gespleißten *atpF*-Transkripte, das freie Intron und die Vorläufer zeigen im Wesentlichen das gleiche Akkumulationsverhalten wie ihre *rps12*-Pendants. Abweichend von *rps12* ist lediglich der Anstieg der Vorläuferlevels in den Blättern 59 Tage alter Pflanzen.

Legende:

Achselkn. = Achselknospen, **D** = Intron-Degradationsprodukte, **I** = Freies Intron, **R** = Reife(s) Transkript(e) (gespleißt), **V** = Intronhaltige Vorläufer, **Z** = Prozessierungs-/Spleißzwischenprodukte (intronhaltig)







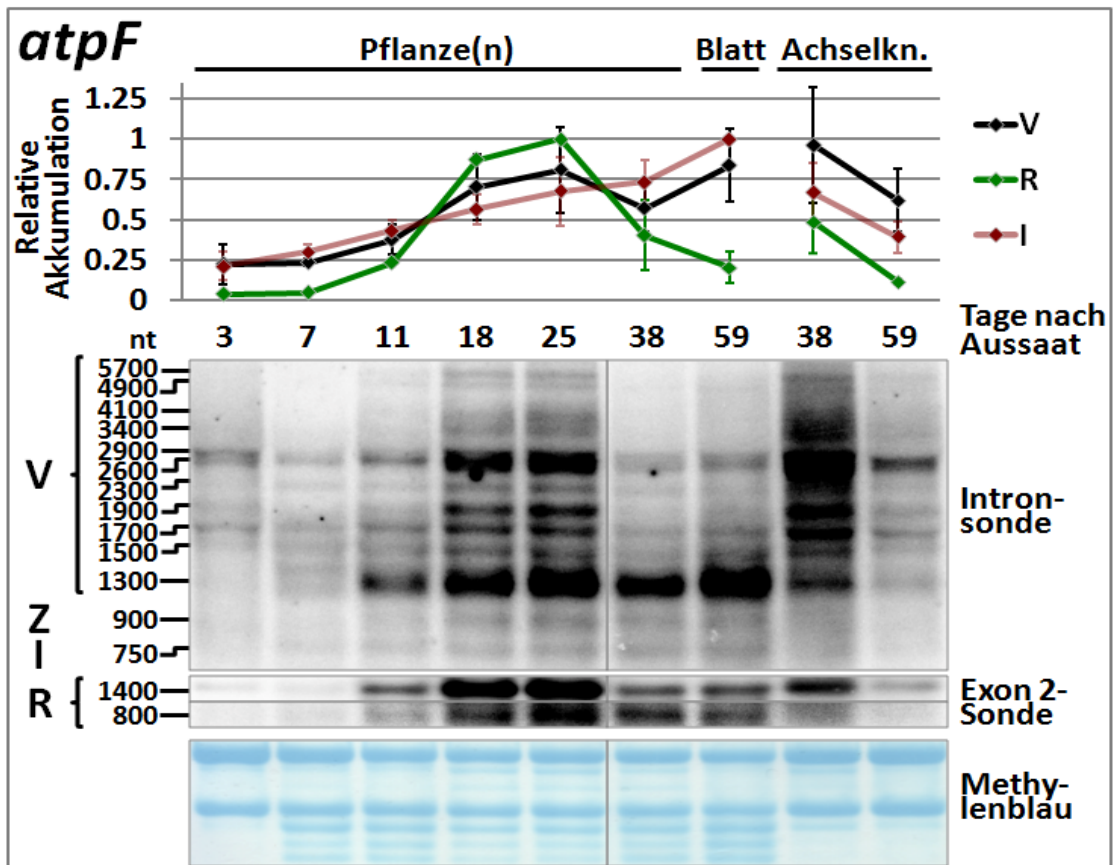
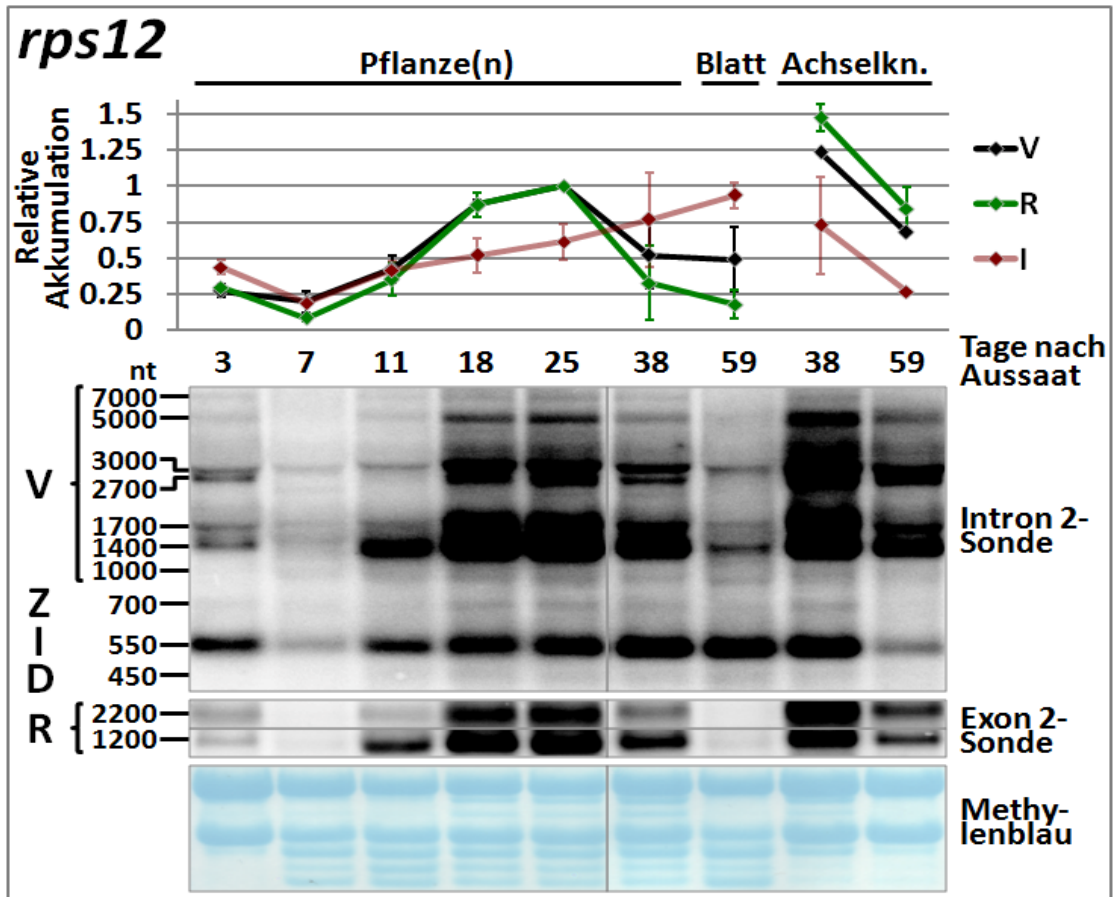


Abb. 18: Quantitative Northern-Analyse der Akkumulation intronhaltiger Vorläufer, freier Introns sowie reifer Transkripte der MatK-Ziele *trnK*-UUU, *trnV*-UAC, *trnI*-GAU, *trnA*-UGC, *rpl2*, *rps12*, *atpF* und der intronhaltigen *trnG*-UCC (Kontrolle). Jeweils 5 µg Gesamt-RNA aus Pflanzen, Blättern und Achselknospen (Achselkn.) transplastomischer Tabakpflanzen verschiedenen Alters (Linien: N+ und C+, s. Abb. 11) wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt (1,5 % Agarose), auf Nylonmembranen transferiert und sukzessive mit Intron- und Exonsonden hybridisiert (Sonden-Primer s. Tab. 4, S. 121). Je Sonde und Altersstufe wurden die Signale von zwei Northern-Analysen (N+, C+) detektiert (Phosphorimager, Bio-Rad) und jeweils entsprechend ihrer Größe und Spezifität für Intron- bzw. Exonsonden in folgende Gruppen zusammengefasst: intronhaltige Vorläufer (V), Prozessierungs- und Spleißzwischenprodukte (Z), freie Introns (I), Intron-Degradationsprodukte (D) oder reife, gespleißte Transkripte (R), s. Text. Nach Quantifizierung (Quantity-One-Software, Bio-Rad) wurden die Signale einer Gruppe jeweils addiert und auf den kumulativen Maximalwert normiert (wegen hoher Varianz wurden Werte von Achselknospen für die Normierung ausgeschlossen). Nach Mittelwertbildung der normierten Werte aus den biologischen Replikaten (N+, C+) wurden diese gegen das Alter der Pflanzen/Organe aufgetragen (Diagramm oben, Intron-Degradations-, Prozessierungs-/Spleißzwischenprodukte nicht gezeigt). Vertikale Linien zeigen Standardabweichungen. Je einer der beiden Filter ist exemplarisch gezeigt (unten, N+ oder C+). Die Signalgrößen wurden anhand halblogarithmischer Eichgeraden, beruhend auf den Größen und Laufweiten von komigrierten Markerbanden berechnet (RiboRuler™ RNA Ladder, High Range und Low Range, Fermentas). Irrelevante Spuren wurden entfernt (senkrechte Linien). Unten: Methylenblau-Färbung (Beladungskontrolle). nt = Nukleotide.

Für die proteinkodierenden MatK-Ziele *atpF*, *rpl2* und *rps12* sollten neben der Expression auf RNA-Ebene auch die Proteinlevels im Altersverlauf analysiert werden. Unter der Annahme, dass die Untereinheiten plastidärer Proteinkomplexe immer in den Mengenverhältnissen vorliegen, die ihrer Häufigkeit im Komplex entsprechen, genügt es, die entwicklungsabhängigen Proteinmengenänderungen einer Untereinheit des ATPase-Komplexes und eines ribosomalen Proteins stellvertretend für die drei proteinkodierenden MatK-Ziele zu untersuchen (s. Abb. 19). Für die quantitative Analyse des ATPase-Komplexes wurde ein AtpB-Antikörper verwendet (Prof. Dr. Barkan; ein kommerzieller AtpF-Antikörper (Abcam) lieferte keine Signale). Die Ribosomenmengen wurden durch einen Rps5-Antikörper analysiert (Prof. Dr. Mache). Sowohl für AtpB als auch für Rps5 wurden spezifische Signale der erwarteten Proteingrößen detektiert. Für beide Proteine zeigten sich keine bzw. geringe Proteinlevels in den nichtgrünen Entwicklungsstufen der Samen bzw. drei Tage alter Keimlinge. In grünen Entwicklungsstadien akkumulieren AtpB und Rps5 mit zunehmendem

Alter der Pflanze, wobei Rps5 bereits in sieben Tage alten Pflanzen ein Maximum erreicht und dann in etwa auf diesem Level stagniert, während AtpB erst in den ausgewachsenen Blättern 59 Tage alter Pflanzen den Höchstwert zeigt. In den Achselknospen finden sich mit zunehmendem Alter der Pflanzen abnehmende Levels beider Proteine. Keine bzw. sehr schwache Akkumulationen von AtpB und Rps5 wurden in Wurzeln und Blüten bzw. Stengeln verschiedenen Alters gefunden (nicht gezeigt).

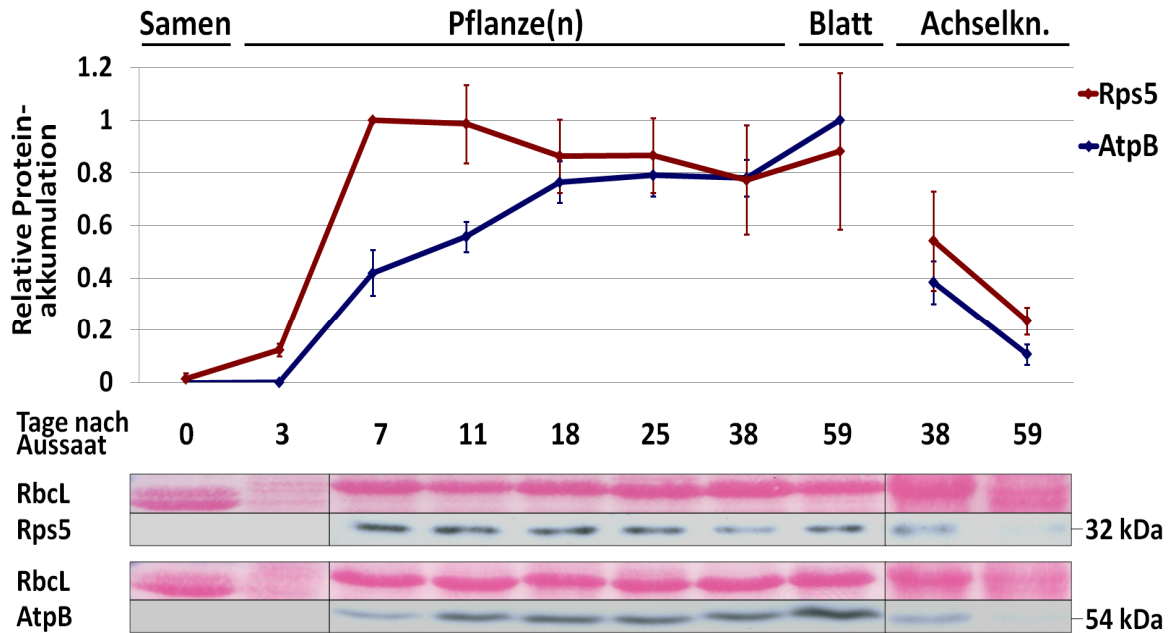
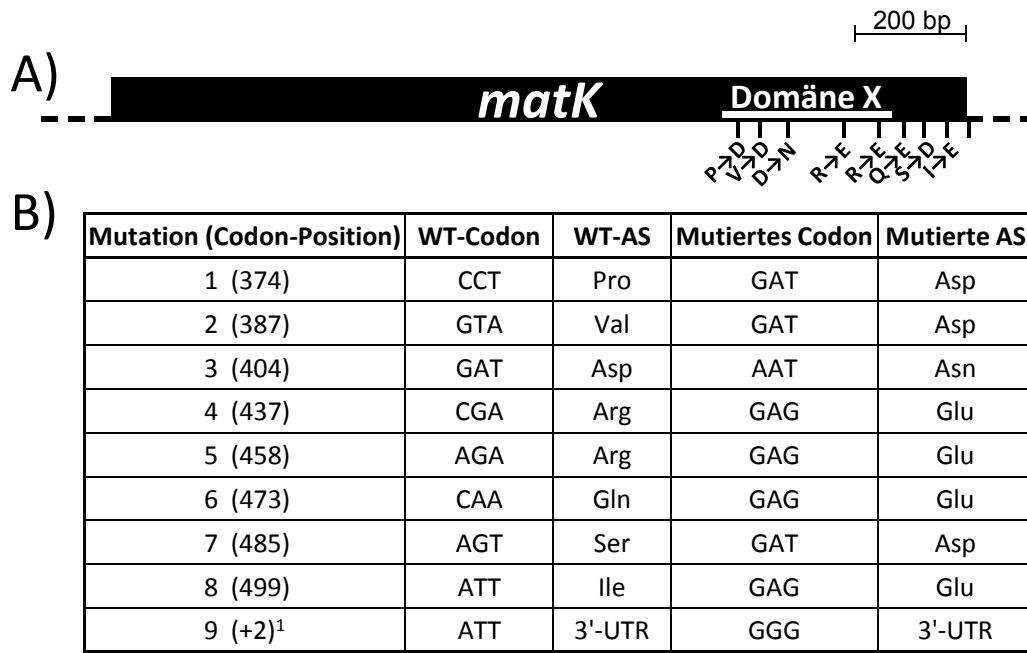


Abb. 19: Quantitative Analyse der entwicklungsabhängigen Rps5- und AtpB-Expression. Gleiche Mengen Gesamtprotein aus Samen sowie Pflanzen, Blättern und Achselknospen (Achselkn.) unterschiedlichen Alters der transplastomischen Linien mit epitopmarkiertem MatK (N+, C+) wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembranen transferiert und für die Western-Analyse mit Rps5- und AtpB-spezifischen Antikörpern eingesetzt. Chemolumineszenzsignale von drei Western-Analysen (zwei biologische Replikate) wurden mit dem Lumi-Imager (Roche) detektiert, quantifiziert (Quantity-One-Software, Bio-Rad), jeweils auf den Maximalwert bezogen und gegen das Alter der Pflanzen aufgetragen (oben). Standardabweichungen sind als vertikale Linien dargestellt. Repräsentative Ausschnitte der Ponceaufärbung (RbcL in grünen Geweben) sowie der Chemoluminogramme sind gezeigt (unten). Irrelevante Spuren wurden entfernt (senkrechte Linien). Die Größen der Signale sind dargestellt. Phänotypen der Pflanzen bzw. Pflanzenteile s. Abb. 11. (kDa = Kilodalton).

Vergleicht man die Western- und Northern-Analysen von MatK und seinen Zielen (s. Abb. 11, Abb. 18, Abb. 19), so lässt sich zusammenfassend festhalten, dass keines der Ziele von MatK eine schlichte Korrelation mit der MatK-Expression zeigt.

3.1.11 Experimente zum Funktionsnachweis von MatK

Wenngleich in dieser Arbeit die Assoziation spezifischer RNAs mit MatK gezeigt werden konnte, ist die Funktion des putativen Spleißfaktors in der Reifung plastidärer RNAs nicht eindeutig belegt. Die Funktionsanalyse durch reverse Genetik, anhand eines gezielten Knockouts von *matK* in transplastomischen Tabakpflanzen, ist nicht möglich (Drescher, 2003, s. Kap. 1.2.6). Daher sollten Punktmutationen in das *matK*-Gen eingebracht werden, um hypomorphe *matK*-Allele zu erzeugen. PCR-basiert wurden neun Punktmutationen in das *trnK*-Intron eingefügt (Transformationsvektor pRZMatK-Mu), wovon acht im *matK*-Leserahmen lokalisiert sind (5 in Domäne X, s. Abb. 20). Um einen Knockout zu vermeiden, wurden ausschließlich Codons ausgetauscht, die in einem MatK-*Alignment* repräsentativer Streptophyten nicht konserviert sind (Turmel et al., 2005). Die Aminosäureaustausche wurden so gewählt, dass die Ladung beeinflusst wird (s. Abb. 20) und die Punktmutationen wurden in einem Abstand von mindestens 30 bp gesetzt, was die Rekombination zwischen den einzelnen Mutationen erlaubt (Kavanagh et al., 1999). Unter der Annahme, dass tolerierbare Mutationen während der Regeneration und Segregation vererbt werden, während starke Mutationen oder Knockouts durch Rekombination zwischen Wildtyp- und Transplastomen eliminiert werden, könnten letztlich homoplastomische, hypomorphe MatK-Mutanten erzeugt werden, deren molekulare (Spleiß-)Phänotypen dem Funktionsnachweis von MatK dienen. Der so generierte Transformationsvektor pRZMatK-Mu wurde für die Plastidentransformation von Tabak eingesetzt (s. Abb. 20). Insgesamt wurden sechs spectinomycinresistente Regenerate isoliert, die alle den Selektionsmarker *aadA* stromabwärts des *matK*-Gens enthielten (PCR-Test mit den *Primern* NtpsbArev2 und aadA-RB-for, nicht gezeigt). Sequenzierungen (*Primer*: aadAoutrev und 3' matK-Au2) zeigten jedoch, dass selbst in primären, wenige Tage alten, transplastomischen Regeneraten keine der Punktmutationen erhalten wurde, was Rekombinationsereignisse im Bereich zwischen dem Resistenzmarker und den Punktmutationen vermuten lässt. Da eine Punktmutagenese prinzipiell möglich ist, selbst wenn der Resistenzmarker mehrere hundert Basenpaare vom Ort der Mutation entfernt liegt (Schmitz-Linneweber et al., 2005b), ist anzunehmen, dass ein starker Selektionsdruck gegen die eingeführten Mutationen wirkte und/oder diese womöglich den Knockout der Proteinfunktion verursachten.



¹ bezeichnet das zweite Basentriplett nach dem Stopcodon

Abb. 20: *matK*-Punktmutagenese. A) Ausschnitt des Transformationsvektors pRZMatK-Mu. Der Vektor pRZMatK-Mu wurde durch PCR-basierte Punktmutagenese aus dem Transformationsvektor pRZC- abgeleitet und ist bis auf die gezeigten Punktmutationen im *matK*-ORF und der -3'-UTR identisch mit diesem (s. Abb. 1, *Primer* s. Tab. 4, S. 121). Die putative RNA-Bindedomäne X sowie ein Größenstandard sind eingezeichnet. Senkrechte Linien der Genkarte zeigen die Position der Punktmutationen, Aminosäureaustausche sind indiziert (Einbuchstabencode). B) Übersicht der Art und Position eingebrachter Punktmutationen (Startcodon = Codonposition 1, WT = Wildtyp, AS = Aminosäure, UTR = nichttranslatierte Region).

Neben dem erläuterten Ansatz der Punktmutagenese ist versucht worden, die MatK-Expression zu manipulieren, um einen mutanten (Spleiß-)Phänotyp zu erzeugen. Dazu wurde eine *NdeI*-Schnittstelle PCR-basiert in eine neutrale Position zwischen Stopcodon und Terminator des *aadA*-Gens in den Transformationsvektor pRZC+ eingebracht (Strategie wie in Schmitz-Linneweber et al., 2001; s. Abb. 6; *Primer*: *NdeI*-*aadA*fw, *NdeI*-*aadA*rev, s. Tab. 4, S. 121). In diese Restriktionsstelle ist die in Abb. 16 für Tabak gezeigte putative Stammschleife, die das *matK*-Startcodon enthält, in bzw. entgegen der Transkriptionsrichtung des *aadA*-Gens kloniert worden, so dass die Vektoren pRZC+Stem bzw. pRZC+Anti erzeugt wurden (Position 3648 - 3696 im Tabakplastom, NCBI-Akzession NC_001879, durch MatK-ATGfw und MatK-ATGrev erzeugt, s. Tab. 4, S. 121). Beide Vektoren wurden für die stabile Plastidentransformation von Tabak eingesetzt. Da das *aadA*-Gen von einem starken 16S-rRNA-Promotor aus

transkribiert wird, führt die Transformation mit pRZC+Stem bzw. pRZC+Anti zur Überexpression des *matK*-Stamm Schleifeninserts bzw. der *matK*-*Antisense*-RNA.

Die ektopische Überexpression der Stamm Schleife könnte durch Titration von negativen bzw. positiven Regulatoren der MatK-Translation (MatK selbst, wenn autoreguliert bzw. andere Translationsfaktoren) von ihren nativen Bindestellen eine Überexpression von MatK bzw. den *Knockdown* der MatK-Expression verursachen.

Wenngleich, bis auf die Inhibition der Edierung durch *Antisense*-RNA (Hegeman et al., 2005), keine Mechanismen der *Antisense*-Genregulation in Chloroplasten beschrieben sind, wurden kleine RNAs mit dem Potential einer solchen Regulation identifiziert (Lung et al., 2006). Überdies sind *Antisense*-Regulationsmechanismen in Cyanobakterien bekannt (z.B. Dühring et al., 2006). Somit könnte die Überexpression eines *matK*-*Antisense*-Fragmentes, z.B. durch Basenpaarung und Translationsinhibition, einen *Knockdown* der MatK-Expression verursachen. Sowohl der *Knockdown* als auch die Überexpression von MatK könnten zu molekularen (Spleiß-)Phänotypen führen, die dem Nachweis der Maturasefunktion dienen.

Aus den Transformationen mit den Vektoren pRZC+Stem und pRZC+Anti wurden je zwei transplastomische Pflanzen gewonnen, für die die Homoplastomie mit einer HA-Epitopsequenz-überspannenden PCR nachgewiesen werden konnte (nicht gezeigt). Diese Pflanzen zeigen keine auffälligen Phänotypen im Vergleich zu Wildtyppflanzen. Eine erste qualitative epitopbasierte Western-Analyse der MatK-Expression ergab keine markanten Anomalitäten (Daten nicht gezeigt). Weitere quantitative Untersuchungen, speziell zur entwicklungsabhängigen Expression von MatK auf RNA- und Proteinebene sind mit den transplastomischen Pflanzen im Vergleich zu (C+)-Kontrolllinien geplant.

3.2 Charakterisierung des PPR-SMR-Proteins P67

3.2.1 Identifikation von P67-Insertionsmutanten

P67 gehört zur kleinen Gruppe der PPR-Proteine mit SMR-Domäne und ist nah mit GUN1, einer Komponente retrograder Signalwege, verwandt. Dies macht P67 zu einem interessanten Untersuchungsobjekt. Um die molekulare Funktion dieses PPR-SMR-Proteins zu charakterisieren, sollten Knockout-Mutanten identifiziert werden. Für einige PPR-Proteine führt der Funktionsverlust in *Arabidopsis* zur Embryoletalität, während der Knockout der Mais-Orthologen erst nach der Keimung letal ist (z.B. Beick et al., 2008; Schmitz-Linneweber et al., 2006). Zudem ist Mais für biochemische Analysen problemlos zugänglich (z.B. durch große Ausbeuten an Pflanzenextrakten), wohingegen *Arabidopsis* ausgezeichnet genetisch charakterisiert ist. Aus diesen Gründen und um für den Fall der Embryoletalität in *Arabidopsis* eine zeiteffiziente Fortführung der Analysen zu gewährleisten, wurden *Arabidopsis*- und Maismutanten parallel identifiziert.

3.2.1.1 P67-Insertionslinien in Mais

Für den *Screen* nach mutanten P67-Allelen in Mais musste zunächst das orthologe Maisgen identifiziert werden. Mit Hilfe der POGs-Software wurde das orthologe Reisgen bestimmt (*OsP67*, NCBI-Akzession: Os03g0215900). Durch BLASTN-Suche konnten, basierend auf der *OsP67*-Sequenz, zwei nahe verwandte Mais-Sequenzen festgestellt werden (Plant GDB BLAST, 84 % bzw. 77 % identische Nukleotide im Homologiebereich, Akzessionen: Sequenz 1 = AC177889.2 bzw. Sequenz 2 = AC217960.3). Weitere Mais-Sequenzen zeigten nur kurze Homologieabschnitte (< 300 bp). Der mit 77 % Homologie weniger nahe verwandten Sequenz 2 fehlen zwei PPR-Domänen sowie die C-terminale SMR-Domäne der *Arabidopsis*- und Reis-P67-Proteine. Desweiteren ist die Anzahl der identischen Nukleotide im Homologiebereich für diese Maissequenz mit 673 bp nur etwa halb so groß wie die der Sequenz 1 mit 1309 bp. Daneben zeigte die reverse BLAST-Suche mit Sequenz 1 gegen das Reisgenom *OsP67* als besten Treffer. Eine cDNA-Sequenz liefert überdies den Nachweis der Expression dieser Maissequenz auf RNA-Ebene (NCBI-Akzession: BT033579). Daher wird Sequenz 1 (NCBI-Akzession: AC177889.2) im Weiteren als P67-Orthologes *ZmP67* bezeichnet. Die Proteinsequenzen der drei orthologen *Arabidopsis*-, Reis- und Maisgene wurden mittels ClustalW-Alignment verglichen (s. Abb. 21). Die drei P67-Orthologen kodieren Protei-

Ergebnisse

<i>At</i> P67	MSFHHL LCSSPSSLLHDPLPLCNLLSVYPKSTPRSFLLSSYNPNS SHFHSRN	50
<i>Os</i> P67	-----MASPSSLL-SWPHRAISLSFQPK-----NPS SPATARV	33
<i>Zm</i> P67	MASLPL CRSPSSLLPSWPHRPISSASFNPK-----NPS-SPVAAHV	39
<i>At</i> P67	L LQAT H VS V Q E AI P QSEKSKLV D VDLPI P EPTASKSYVWVNP K SPRAS SQL	100
<i>Os</i> P67	SVQ D PP P -----PPSDA-----NPS PGR -SSNTSRVWVNPNSPRA AGL	71
<i>Zm</i> P67	SVQ E T P PP Q Q D PS P PSDS-----NP N GT R PS S SSSN T R F L W V N P N SPRA ADV	85
<i>At</i> P67	R RKSY D S- R YSS L I K LAES L DACK P NEAD V CDV I T G - F GG K L F E Q DAV V T	148
<i>Os</i> P67	A RIARAGSGRRAR L AA A AAAL A ACE A GE A P V AAAL E AA F PE P PE Q DAV I V	121
<i>Zm</i> P67	A RIARAGSGRRAR L AS A AAAL G AC E T T ES A V E AA L QA A F P PE P PE Q DAV I V	135
<i>At</i> P67	L LNMTN - - P ET A PL V L N N L L E TM K PSRE V I L YN V T M K V FR K S K D L E K S E K	196
<i>Os</i> P67	L N T T S A - R PA A V V L A L W W F L R NA E V R KE V I L YN V A L K A L R K R R R W S D A E A	170
<i>Zm</i> P67	L N T AA A T R A E T A V L A L R W F L G N A K V R K V I L YN V V L K L L R K K R L W S E T E A	185
<i>At</i> P67	L FDEML E R G I K PD N AT F T T I I SCAR Q NG V PKRA V E W F E K M SS F GC E PD N V	246
<i>Os</i> P67	L WE E ML R E G V Q PD N AT F ST V I S CAR A CG M PG K AV E W F E K MP D FG C SP D ML	220
<i>Zm</i> P67	L WA E ML R D G V Q PD N AT F ST V I S CAR A CG L H S K A V E W F D K MP E FG C SP D ML	235
<i>At</i> P67	T MA A M I DAY G R A GN V DM A LS L Y D R A RT E K W R I DA V T F ST L I R I Y GV S GN Y	296
<i>Os</i> P67	T YSA V ID A Y G R A GD A ET A L R L Y D R AR A E K W Q LD P V I CA T V I R V H S SS G N F	270
<i>Zm</i> P67	T YSA V ID A Y G H A GN S E A AL R L Y D R AR A E K W Q LD P V I C S T V I K V H S T S G N F	285
<i>At</i> P67	D G C L N I Y E E M K AL G V K PN L V I Y N R L I D S M G R A K R P W Q A K I I Y K D L I T NG F	346
<i>Os</i> P67	D G A L N V F E E M K AA G V K PN L V V Y N T V L D A M G R A M R P W V V K T I H R E L V S Q E A	320
<i>Zm</i> P67	D G A L N V F E E M K A I G V R P N L V V Y N T M L D A M G R A L R P W V V K T I H R E M V D Q Q V	335
<i>At</i> P67	T PN W ST Y AA L VR A Y G R A RY G DD A L A I Y RE M KE K GL S LT V I L Y N T L LS M CA	396
<i>Os</i> P67	V PN K AT Y CC L L H AY T R A RY G ED A MA V Y R V M K D E V MD I D V V L Y N M L LS M CA	370
<i>Zm</i> P67	Q PS R AT Y CC L L H AY T R A RY G ED A MA V Y R L M K D E A M G I D V M L Y N M L L LS M CA	385
<i>At</i> P67	D IG V DE A E E I F Q D M K NC E T C DP D - - S W T F S SL I T V Y A C S GR V S E A E A A L	444
<i>Os</i> P67	D IG V E E A E E I FR D M K AS M DR S K P DS W S Y SS M V T LY S CT G N V AG A E G I L	420
<i>Zm</i> P67	D IG V DE A E E I F RD M K A S M G A H S K P DS W S Y SS M V T LY S S T AN V L S A E G I L	435
<i>At</i> P67	L Q M RE A GF E PT L FL V LT S V I Q C Y G K A K Q V D D V RT F D Q V L EL G IT P DD R FC	494
<i>Os</i> P67	N EM V E A GF K PN I F I LT S L I RC Y G K AG R T D D V RS F AM L E D LG I T P DD R FC	470
<i>Zm</i> P67	N EM V E A GF K PN I F V LT S L I RC Y G K V G RT D D V RS F GM L Q D LG I T P DD R FC	485
<i>At</i> P67	G CL L N V MT Q TP S EE I G K L I GC V E K AK P K L G Q V V K M L V EE Q NC E EG V F K KE	544
<i>Os</i> P67	G CL L T V AG T PA D EL G K V I G C I DR S SA Q L G AV V R L L V D - AA A P S E P L R E A	519
<i>Zm</i> P67	G CL L S V A A NT P A E EL G K V I S C I E R S N V Q L G AV V K L L V D - R S S - S E S F R E A	533
<i>At</i> P67	A SEL I D S I G S D V K K A Y L N C L I D L C V N L N K L E R A C E I L Q L G L E Y D I Y T G L Q	594
<i>Os</i> P67	A G E LL G ARG V R M P Y C N L M D L A V N L S Q ME K A C ALL D V A L R L G I Y S N V Q	569
<i>Zm</i> P67	A RE L L R SS R GV V K M P Y C N L M D L C V N L N Q ME K A C ALL D A A Q L G I Y A N I Q	583
<i>At</i> P67	S KS A T Q W S L H L K S L S L G A AL T AL H V W M N D L SE A A L ES G E E F P PL L G I HT G	644
<i>Os</i> P67	T RT Q T Q W S L H L R G L SV G A A L T TL H V W M S D L Y A AL Q AG - D EL P PL L G I HT G	618
<i>Zm</i> P67	T RT Q T Q W S L H L R G L SV G A A L T TL H V W M N D L Y T SL Q T G N E GL P PL L G I HT G	633
<i>At</i> P67	H G K H K Y S DK L AA V F E SH L K E LN A PF H E A PD K V G W F LT T S V AA K AW L E F R	694
<i>Os</i> P67	Q G K NT S Y K GL A T V F E SH L K E LD A PF H E A PD K AG W FL T T S V A A R H W L E T K	668
<i>Zm</i> P67	Q G K NT S DR G L A AM F E A HL K E L D A PF H E A PD K AG W FL T T N V A A K Q W L E S K	683
<i>At</i> P67	R S A GG V S A 702	
<i>Os</i> P67	K S A EL V A V 676	
<i>Zm</i> P67	A S E L V T V 691	

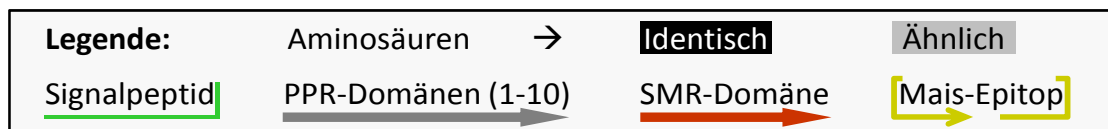


Abb. 21: ClustalW-Alignment der Aminosäuresequenzen der P67-Orthologen aus *Arabidopsis thaliana* (*At*), *Oryza sativa* (*Os*) und *Zea mays* (*Zm*, erste, zweite, dritte Zeile). Identische Aminosäuren sind weiß auf schwarzem Hintergrund, Aminosäuren mit ähnlichen physikochemischen Eigenschaften schwarz auf grauem Hintergrund dargestellt. Die plastidären Signalpeptide (mit TargetP vorhergesagt), die zehn kanonischen PPR-Domänen (jeweils mit TPRpred vorhergesagt), die SMR-Domäne (laut Annotation für *At* und *Os*) sowie ein für die Antikörpergewinnung heterolog exprimiertes Epitop aus *Zm* sind gezeigt (siehe Legende). P67-Akzessionen (NCBI): CAC01928.1 (*At*), BAF11294.2 (*Os*), BT033579 (*Zm*).

ne mit 10 kanonischen PPR-Domänen und einer C-terminalen SMR-Domäne. Sie zeigen ausgedehnte Homologien und variieren lediglich im Bereich der vorhergesagten N-terminalen plastidären Lokalisationssequenzen stärker. Das *Alignment* zeigt eine vergleichbare Homologie der Aminosäuresequenz des P67-Proteins aus Reis bzw. Mais zum *Arabidopsis*-Orthologen (70 % bzw. 69 % ähnliche, 52 % bzw. 51 % identische Aminosäuren). Die P67-Orthologen der beiden Monokotyledonen zeigen 89 % ähnliche und 80 % identische Aminosäuren.

Die *ZmP67*-Sequenz bildete die Basis für einen reversen genetischen *Screen* nach Mu-Insertionslinien (Mutator) in einer Samenbank mit ~ 2300 Mu-Transposon-induzierten nichtphotosynthetischen Maismutanten (in Kooperation mit Prof. Dr. Alice Barkan, <http://chloroplast.uoregon.edu>). Jede dieser Maismutanten ist in der DNA-Bank durch eine DNA-Probe repräsentiert. Die komplette DNA-Bank wurde durch PCRs mit *P67*-genspezifischen und Transposon-spezifischen *Primern* sowie anschließende Southern-Analyse auf *P67*-Insertionsallele untersucht (Williams und Barkan, 2003; PCR-Primer: EoMu-Mix, ZmPPR52-4-3' bzw. ZmPPR52-4-5'a; Sonden-Primer: ZmPPR52-1/3-5', ZmPPR52-4-3', s. Tab. 4, S. 121). Insgesamt wurden vier *P67*-Insertionslinien identifiziert (*ZmP67-1* und *ZmP67-1A* [Nachkommen einer Familie], *ZmP67-2*, *ZmP67-3*). Die Insertionsumgebungen wurden sequenziert. *ZmP67-1* ist in der 5'-UTR, die übrigen Insertionen sind in der kodierenden Region stromaufwärts der PPR-Domänensequenzen lokalisiert (s. Abb. 22A). *ZmP67-1* und -3 zeigen die für den Insertionsprozess charakteristischen, direkten Sequenzwiederholungen beidseitig des Mu-Elements (Barker et al., 1984). Für *ZmP67-2* ist lediglich eine Grenze sequenziert und *ZmP67-1A* zeigt eine ungewöhnliche Deletion von 65 bp, die das *P67*-Startcodon einschließt. Pflanzen der Insertionslinien *ZmP67-1A*, -2 und -3, die homozygot bezüglich der Insertionen sind, zeigen schwach (z.T. gekörnt) hellgrüne Phänotypen und sterben zwei bis drei Wochen nach der Keimung (s. Abb. 22B, -C). Reinerbige Nachkommen der Insertionslinie *ZmP67-1*, die sich in der 5'-UTR befindet, unterscheiden sich nicht von wildtypischen Pflanzen (s. Abb. 22B). Unter der Nachkommenschaft aus Kreuzungen von Heterozygoten der Insertionslinien 1, 2 und 3 (*ZmP67-1/+*, *-2/+*, *-3/+*), sogenannten Komplementationstest-Kreuzungen, segregieren schwach hellgrüne, keimlingsletale Pflanzen (s. Abb. 22D). Dies zeigt, dass die Insertionen sich nicht komplementieren können und somit in *cis* lokalisiert und ursächlich für den chlorophylldefizienten Phänotyp sind.

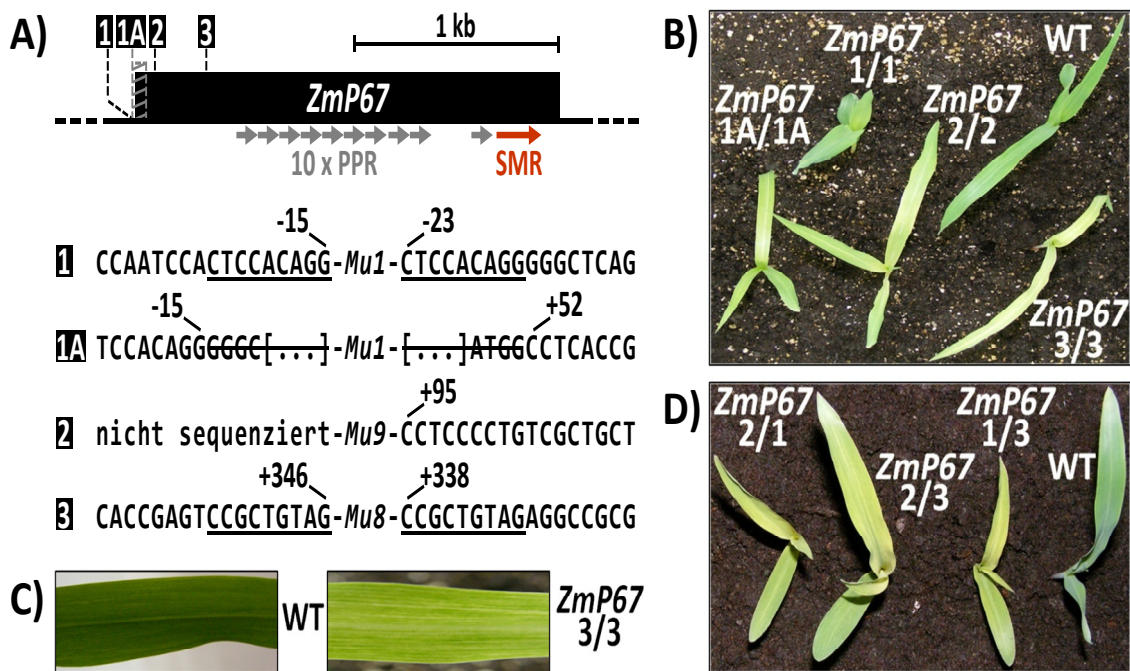


Abb. 22: Übersicht der *P67*-Insertionslinien in *Zea mays* (*Zm*) und Komplementationstests. A) Oben: Insertionen von Mu-Elementen sind in einer Karte des *ZmP67*-Gens als senkrechte gestrichelte Linien indiziert und entsprechend den Pflanzenlinien *ZmP67*-1, -1A, -2, -3 bezeichnet (*ZmP67*-1 und -1A = Nachkommen einer Familie). Ein Größenmaßstab ist dargestellt. Graue Schraffur = durch Insertion 1A verursachte Deletion. Schwarzes Rechteck = kodierende Region (Transkriptionsrichtung nach rechts), Pfeil(e) in grau und rot = PPR- und SMR-Domäne(n). Unten: Sequenzumgebungen der Insertionen in *ZmP67*. Zahlen geben die relative Position zum Startcodon an (ATG = +1, +2, +3, NCBI-Akzession: BT033579). Unterstrichene bzw. durchgestrichene Sequenzen zeigen durch den Insertionsprozess hervorgerufene, direkte Nonamer-Sequenzwiederholungen bzw. Deletionen. Der Typ des Mu-Elements wurde durch Sequenzpolymorphismen in den terminalen invertierten Regionen bestimmt (*Mu1*, -8, -9). [...] = Sequenzauslassung. B) Homozygote Pflanzen der Insertionslinien *ZmP67*-1A, -2, -3 zeigen schwach hellgrüne Phänotypen im Vergleich zum wildtypischen Erscheinungsbild der Wildtypkontrollpflanze (WT) und der 5'-UTR-Linie *ZmP67*-1 (12 d alte Keimlinge). C) Ausschnittsvergrößerungen verdeutlichen den, z.T. körnig erscheinenden, hellgrünen Phänotyp einer *P67*-Mutante gegenüber der Wildtypkontrolle. D) *Cis-Trans*-Tests mit Hilfe von Kreuzungen der Insertionslinien *ZmP67*-1, -2 und -3 zeigen keine phänotypische Komplementation in heterozygoten Nachkommenpflanzen und damit die *cis*-Lokalisation der Insertionen sowie deren Ursächlichkeit für den beobachteten chlorophylldefizienten Phänotyp.

Dabei kann die nichtkomplementierende Nachkommenschaft der Kreuzungen mit *ZmP67*-1 ein Hinweis darauf sein, dass auch diese 5'-UTR-Linie eine reduzierte *P67*-Expression aufweist, deren Levels im homozygoten Zustand adäquat für die Ausprä-

gung des wildtypischen Erscheinungsbildes sein könnten. Die Abkömmlinge der Komplementationstests wurden für die weiteren Experimente verwendet, da zusätzliche im Hintergrund segregierende Mu-Elemente in ihnen heterozygot vorliegen und keinen Einfluss auf den Phänotyp haben.

3.2.1.2 P67-Insertionslinien in *Arabidopsis*

Eine Ds-Transposon- (*Dissociation*) und eine T-DNA-Insertionslinie (Transfer-DNA) wurden *in silico* mit Hilfe der T-DNA-Express-Suchmaschine (<http://signal.salk.edu/>) in den CSHL-Genetrap- und SAIL-Samenbanken identifiziert (<http://genetrap.cshl.edu/>, <http://signal.salk.edu/>). Beide Insertionen befinden sich im kodierenden Bereich des *Arabidopsis-P67*-Gens (*AtP67*, s. Abb. 23, NCBI-Akzession: At4g16390, AJ243545). Samen dieser Linien wurden im CSHL bzw. NASC geordert und propagiert. Durch PCRs und Sequenzierungen wurden der Genotyp und der Ort der Insertionen festge-

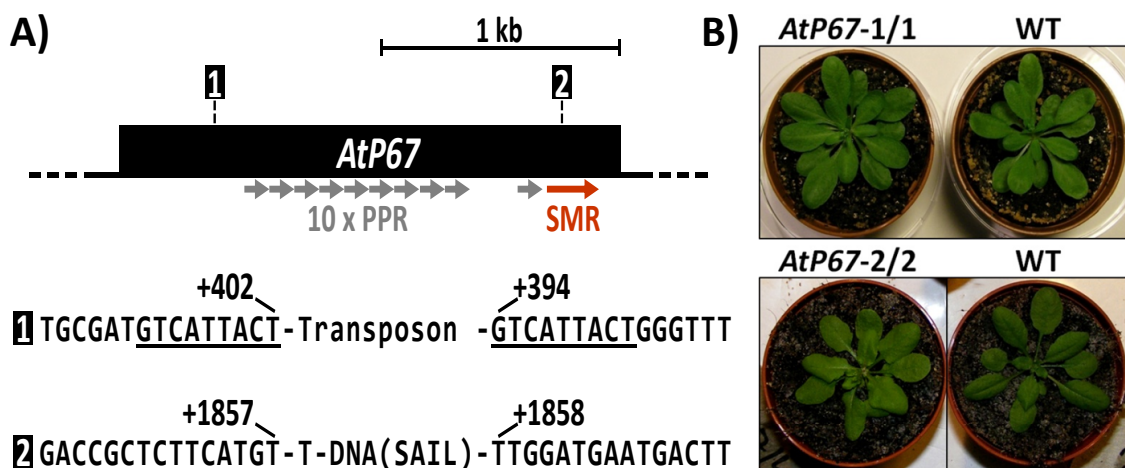


Abb. 23: Übersicht der *P67*-Insertionslinien in *Arabidopsis* (*At*). A) Oben: Übersichtskarte des *AtP67*-Gens. Senkrechte gestrichelte Linien indizieren Transposon- oder T-DNA-Insertionen und sind entsprechend den Insertionslinien *AtP67-1* und *-2* bezeichnet. Ein Größenmaßstab ist gezeigt. Schwarzes Rechteck = kodierende Region (Transkriptionsrichtung nach rechts). Pfeil(e) in grau und rot = PPR- und SMR-Domäne(n). Unten: Sequenzumgebungen der Insertionen in *AtP67*. Zahlen geben die relative Position zum Startcodon an (ATG = +1, +2, +3, NCBI-Akzession: At4g16390, AJ243545). Eine durch den Insertionsprozess verursachte direkte Sequenzwiederholung ist unterstrichen. Der Insertionstyp ist gezeigt (1 = Transposon [Ds-Element], CSHL; 2 = T-DNA, SAIL). *AtP67-2* enthält zwei diametral orientierte T-DNA-Sequenzen. B) Die Phänotypen von Pflanzen der homozygoten Insertionslinien *AtP67-1* und *-2* unterscheiden sich unter Standard-Anzuchtbedingungen nicht von denen wildtypischer Kontrollpflanzen (30 d alte Pflanzen).

stellt (Akzessionen der Linien: CSHL_GT20858 bzw. N819547; *Primer*: PPR52-GFP_fw, PPR52-GFP-Seq-rev1, Ds5-1, Ds3-2 bzw. SAILfw, SAILrev, LB1, SAIL-RB 100; s. Tab. 4, S. 121). Die CSHL-*Genetrap*-Linie *AtP67-1* bzw. die SAIL-T-DNA-Linie *AtP67-2* zeigen eine Transposon- bzw. T-DNA-Insertion im ORF von *P67*, die stromaufwärts der PPR-Domänen- bzw. innerhalb der SMR-Domänensequenz(en) lokalisiert ist (s. Abb. 23A). Beidseitig der Transposon-Insertion *AtP67-1* wurde die für den Integrationsprozess charakteristische, direkte Sequenzwiederholung gefunden. Die T-DNA-Insertion *AtP67-2* enthält zwei gegenläufig orientierte T-DNA-Sequenzen. Bezüglich der Insertionen homozygote Pflanzen der Linien *AtP67-1* und -2 unterscheiden sich unter Standard-Anzuchtbedingungen nicht von wildtypischen Kontrollpflanzen und lassen sich problemlos propagieren (s. Abb. 23B). Lediglich unter Temperaturstress-Bedingungen ($> 35\text{ }^{\circ}\text{C}$) wurde eine marginale Entwicklungsverzögerung der Insertionslinien gegenüber wildtypischen Pflanzen beobachtet (nicht gezeigt).

Insgesamt wurden vier Mais- und zwei *Arabidopsis*-Insertionslinien für *P67* identifiziert. Homozygote Insertionen in *ZmP67* verursachen schwach hellgrüne Phänotypen, die Keimlinge sterben 2 - 3 Wochen nach der Aussaat. Demgegenüber rufen reinerbige Insertionen in *AtP67* unter Standard-Anzuchtbedingungen keinen Phänotyp hervor.

3.2.2 Knockout der P67-Expression in Mais-Insertionslinien

Um die *P67*-Expression untersuchen zu können sowie für eine weiterführende Charakterisierung des Proteins, z.B. durch RIP-Chip-Analysen, wurde ein gegen *P67* gerichteter Antikörper erzeugt. Für die Gewinnung des *P67*-Antiserums wurde der C-terminale Teil von *ZmP67* (AS 441 - 691, s. Abb. 21) heterolog in *E. coli* exprimiert und zur Immunisierung von Kaninchen eingesetzt (Firma Eurogentec, s. Kap. 2.2.21). Abb. 24 zeigt die Applikation des gereinigten *P67*-Antiserums (*P67*-Antikörper) in Western-Analysen. Die immunologische Untersuchung von Gesamtproteinextrakten zeigte ein spezifisches Signal der erwarteten Größe in wildtypischen Kontrollpflanzen (*ZmP67* ohne Signalpeptid $\sim 72\text{ kDa}$), das in den analysierten homozygoten Mais-Insertionslinien sowie der Nachkommenschaft der Komplementationstests nicht detektiert wurde (s. Abb. 24A). Dies belegt die Spezifität des Antikörpers für das *ZmP67*-Protein und zeigt den Knockout der *P67*-Expression in den untersuchten Linien. Die plastidäre Lokalisation von *P67* ist bereits nachgewiesen (Lahmy et al., 2000; Lurin et al., 2004). Western-Analysen der

löslichen und unlöslichen Chloroplastenfraktionen von wildtypischen Pflanzen zeigten eine deutliche Anreicherung des *ZmP67*-spezifischen Signals in der Stromafraktion, was für eine entsprechende subplastidäre Lokalisation spricht (s. Abb. 24B). Trotz z.T. ausgeprägter Homologien zwischen *ZmP67* und *AtP67* im Bereich der Epitopsequenz (s. Abb. 21) zeigten analoge Western-Analysen in *Arabidopsis* keine Signale der erwarteten Größe (nicht gezeigt).

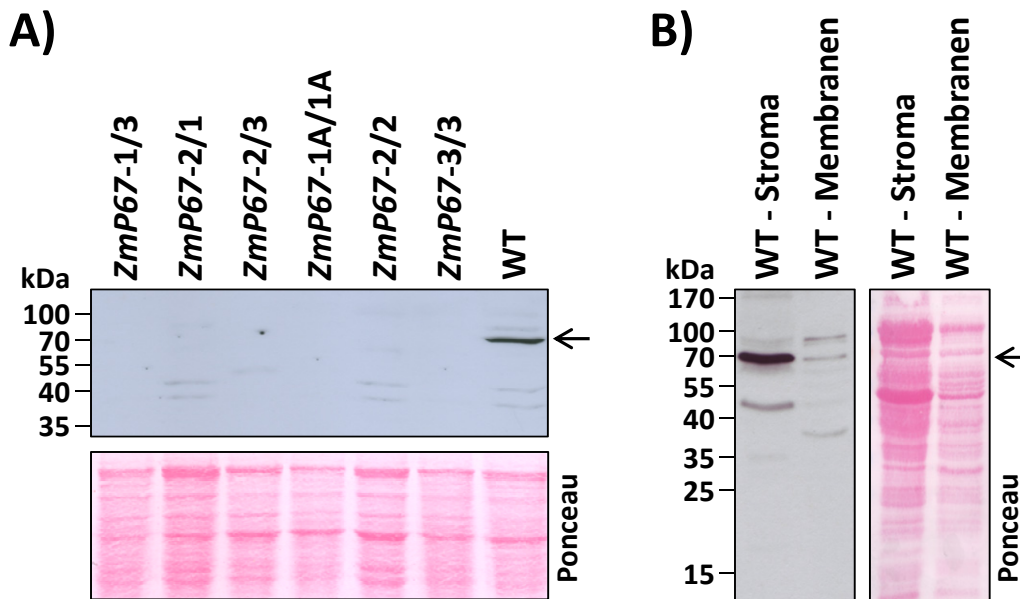


Abb. 24: Bestätigung der P67-Antikörperspezifität und immunologischer Nachweis des *P67*-Knockouts in Mais-Insertionslinien sowie der *P67*-Lokalisation im Stroma. Die Analysen wurden einmal mit gleichem Ergebnis wiederholt. Die Ponceaufärbung der Membranen ist gezeigt. Pfeil = Größe des *ZmP67*-Signals, kDa = Kilodalton, WT = Wildtyp. A) Nachweis der *P67*-Antikörperspezifität und des Knockouts der *ZmP67*-Expression in Mu-Insertionslinien. Gleiche Mengen Gesamtprotein aus Mais-Insertionslinien sowie deren nichtkomplementierender Nachkommenschaft (14 d alt) wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembranen transferiert und für die Western-Analyse mit dem *P67*-Antikörper eingesetzt. Das *ZmP67*-spezifische Signal findet sich ausschließlich in der wildtypischen Kontrollpflanze nicht aber in den Insertionslinien. B) Anreicherung von *ZmP67* in der löslichen Fraktion der Chloroplasten. Chloroplasten aus 10 d alten wildtypischen Pflanzen (WT) wurden lysiert und in Membran- und Stromabestandteile separiert. Der Proteingehalt der Fraktionen wurde quantifiziert. Gleiche Mengen wurden für die Western-Analyse mit dem *P67*-Antikörper eingesetzt.

Zusammenfassend zeigen die immunologischen Analysen den Knockout von *ZmP67* in den Insertionslinien *ZmP67*-1A, -2 und -3 sowie die subplastidäre Lokalisation im Stroma. Der Knockout von *ZmP67* in den Kreuzungen mit *ZmP67*-1 ist ein Hinweis auf

reduzierte P67-Expressionslevels in dieser 5'-UTR-Linie (*ZmP67-1/1* selbst ist aufgrund des fehlenden Phänotyps nicht untersucht worden).

3.2.3 P67-Expression in *Arabidopsis*-Insertionslinien

Der Nachweis des *AtP67*-Knockouts auf Proteinebene mit Hilfe des P67-Antikörpers ist mangels Kreuzspezifität nicht möglich (s. Kap. 3.2.2). Aus diesem Grund wurden die *P67*-Expressionslevels der Insertionslinien *AtP67-1* und *-2* durch RT-PCR untersucht (s. Abb. 25). Diese Analysen zeigten, dass in Pflanzen beider Insertionslinien, die homozygot bezüglich der Insertion sind, keine *P67*-Transkripte nachweisbar sind. Dagegen waren diese Transkripte in wildtypischen Kontrollpflanzen problemlos detektierbar. Sofern die stromaufwärts der Insertion gelegenen Sequenzen noch transkribiert werden, würde dies in *AtP67-1* den Abbruch der Translation noch vor den PPR-Domänen bedeuten (Stopcodon im Transposon an Codonposition + 144, *P67*-Startcodon = + 1),

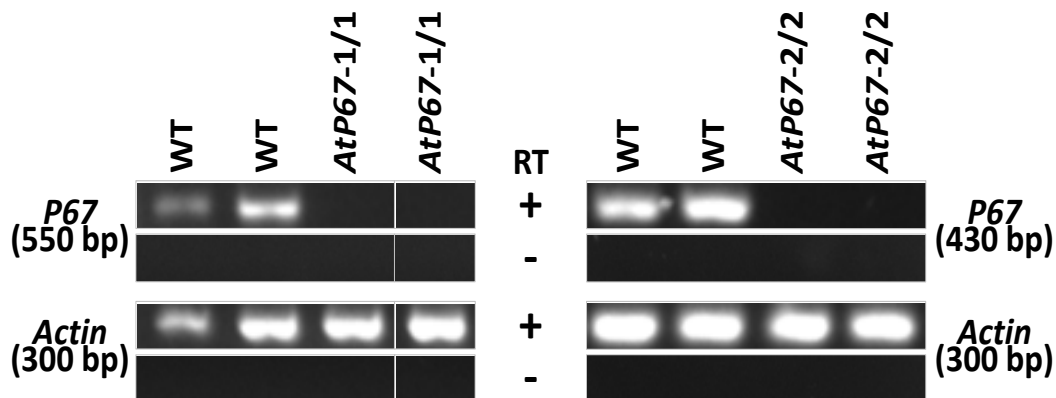


Abb. 25: Nachweis des Defizits an *P67*-Transkripten in *AtP67*-Insertionslinien. Gesamt-RNA homozygoter *P67*-Insertionslinien (*AtP67-1* bzw. *-2*) und wildtypischer Kontrollpflanzen (WT, je 30 d alt) wurde revers transkribiert (+RT, QuantiTect Kit, Qiagen) und zum Nachweis von *P67*-Transkripten für PCRs mit Transposon- bzw. T-DNA-überspannenden *Primern* genutzt (oben links bzw. rechts, 35 Zyklen, je zwei biologische Replikate). Während *P67*-Transkripte in den Kontrollpflanzen nachgewiesen werden konnten, wurden keine entsprechenden Signale in den Insertionslinien *AtP67-1* und *-2* detektiert. In allen Linien konnte die *Actin*-mRNA nachgewiesen werden, was die erfolgreiche reverse Transkription belegt (unten links bzw. rechts, 35 Zyklen). Kontrollen ohne reverse Transkription (-RT) sowie das intronfreie Produkt der intron-überspannenden *Actin*-PCR zeigen, dass die beobachteten Signale von RNA-*Templates* abstammen. Irrelevante Spuren wurden entfernt (senkrechte Linien). Die Analyse wurde einmal mit gleichem Ergebnis wiederholt. *Primer*: *Actin* (ActAtcDNAfw und -rev), *AtP67-1* (PPR52-GFP-Seqrev1 und PPR52-GFP-fwneu), *AtP67-2* (PPR52-GFP-Seqfw3 und -rev3); s. Tab. 4, S. 121.

wohingegen in *AtP67-2* in diesem Fall lediglich ein Teil der SMR-Domäne deletiert wäre (Stopcodon in T-DNA an Codonposition + 632).

3.2.4 P67-Immunopräzipitation

P67 enthält PPR-Domänen und eine SMR-Domäne, so dass es sich um ein RNA- und/oder DNA-bindendes Protein handeln könnte. Für eine Identifikation P67-assoziiierter RNA/DNA musste die Immunopräzipitation mit Hilfe des P67-Antikörpers etabliert werden. Dazu wurden Test-Immunopräzipitationen auf Stromafraktionen wildtypischer Maispflanzen mit dem P67-Antikörper ausgeführt. Die anschließende Western-Analyse der Fraktionen dieser Immunopräzipitationen zeigte die Anreicherung von P67 in der Pelletfraktion und damit die Eignung des P67-Antikörpers für die Präzipitation des Proteins aus Stromaextrakten (s. Abb. 26).

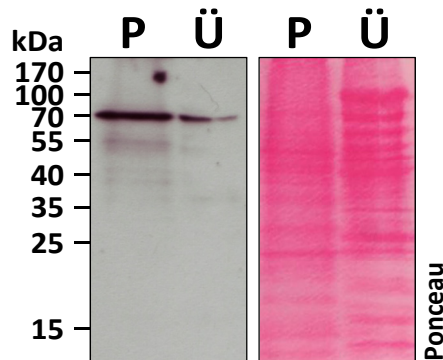


Abb. 26: Immunologische Analyse der Immunopräzipitation von *ZmP67* aus Stromafraktionen wildtypischer Maispflanzen. Pellet- und Überstandsanteile (3 : 1) aus der Immunopräzipitation mit dem P67-Antikörper auf Stromaextrakten wildtypischer Maispflanzen (10 d alt) wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und für die Western-Analyse mit dem P67-Antikörper verwendet. Für den Nachweis wurde das One-Hour-IP-Western-Kit (GenScript) genutzt, das die Detektion des denaturierten P67-Antikörpers aus der Immunopräzipitation verhindert. Ein Ausschnitt der Ponceaufärbung ist gezeigt. P = Pellet, Ü = Überstand, kDa = Kilodalton. Die Analyse wurde mehrmals mit gleichem Ergebnis wiederholt.

Um zwischen der Bindung von RNA bzw. DNA unterscheiden zu können, wurden co-präzipitierte sowie ungebundene Nukleinsäuren aus P67-Immunopräzipitationen in unterschiedlichen Ansätzen einer DNase- bzw. RNase-Behandlung und alkalischer Hydrolyse unterzogen, jeweils differentiell mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert und anschließend kompetitiv auf Mais-Chloroplastengenom-*Tiling-Arrays* hybridisiert (RIP-/DIP-

Chip = RNA-/DNA-Immunopräzipitation und Chip-Hybridisierung, s. Kap. 2.2.17.1). In beiden Fällen zeigten initiale Experimente keine spezifischen Anreicherungen (Anreicherungs-werte < 2, nicht gezeigt). Weitere Analysen sind nötig, um P67-gebundene Transkripte oder DNA-Abschnitte zu ermitteln.

3.2.5 P67 und retrogrades *Signalling*

Die Vermutung einer Beteiligung von P67 am retrograden *Signalling* wird durch die enge Verwandtschaft zu GUN1, einem essentiellen Bestandteil dieser Signalwege, nahegelegt. Eine Standardmethode für den Nachweis einer Beteiligung an retrograden Signalwegen in *Arabidopsis* ist die Norflurazonbehandlung von Mutanten der Signalkandidaten und anschließende Northern-Analyse kernkodierter Gene der Photosynthese (z.B. *LhcB*-Transkripte, s. Abb. 27). Norflurazon ist ein Inhibitor der Carotinoidbiosynthese und verursacht im Licht photo-oxidative Schäden, die durch retrograde Signale

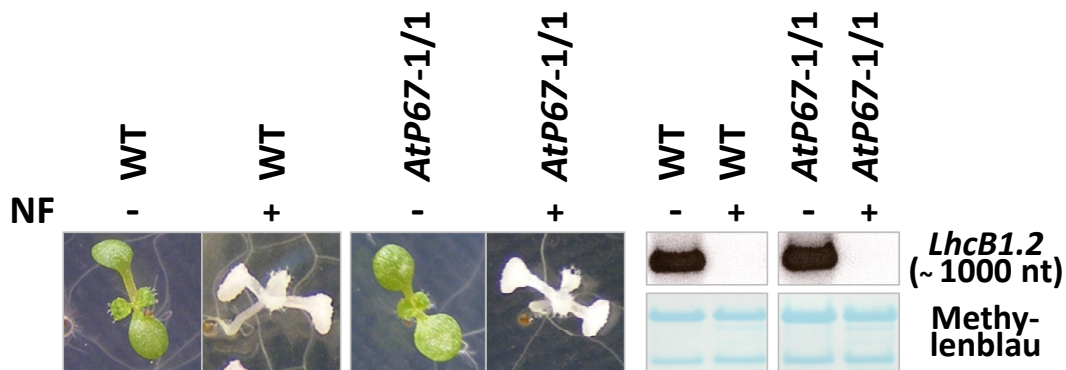


Abb. 27: *AtP67*-Mutanten zeigen keinen *Genomes-Uncoupled*-Phänotyp (GUN) nach der Behandlung mit Norflurazon. Samen wildtypischer *Arabidopsis*-Pflanzen sowie der homozygoten Linie *AtP67-1/1* wurden oberflächensterilisiert, nach Aussaat für acht Tage auf Murashige-und-Skoog-Medium mit (+) oder ohne (-) Norflurazon (NF, 5 μ M) unter Standard-Anzuchtbedingungen kultiviert und für die Isolation von Gesamt-RNA verwendet. Links: Phänotypen der Norflurazon-behandelten und unbehandelten Keimlinge. Rechts: Jeweils 5 μ g Gesamt-RNA wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt (1,5 % Agarose), auf eine Nylonmembran transferiert und mit einer *LhcB1.2*-spezifischen Sonde hybridisiert (Sonden-Primer: CAB3_fw, CAB3_rev, s. Tab. 4, S. 121). Die Methylenblau-Färbung der Membran ist gezeigt (unten). Sowohl in wildtypischen Keimlingen als auch in *AtP67*-Insertionsmutanten führt die Norflurazongabe zur Repression der *LhcB1.2*-Expression. Die für den GUN-Phänotyp charakteristische Entkopplung dieser Expressionsrepression von der Norflurazongabe wurde nicht beobachtet.

zur Expressionsrepression kernkodierter Gene des Photosyntheseapparates führen (z.B. *LhcB1*, *RbcS*). Bei Störung der retrograden Signalwege, z.B. durch den Knockout von Komponenten des retrograden *Signallings*, ist diese Reaktion blockiert, man spricht vom GUN-Phänotyp (*Genomes Uncoupled*, z.B. Koussevitzky et al., 2007). Norflurazonbehandlung und folgende Northern-Analyse der *LhcB*-Expression in der Insertionslinie *AtP67-1* zeigten keine Derepression der Expression des Kerngens *LhcB1.2* (s. Abb. 27). Damit wird eine Beteiligung von P67 an retrograden Signalwegen unwahrscheinlich, wenngleich dieses Ergebnis sie nicht ausschließt. Weitere Untersuchungen alternativer Signalwege sind nötig, um dieses Resultat abzusichern (z.B. Hemmung der plastidären Translation mit Lincomycin).

3.2.6 Stark reduzierte AtpB-Akkumulation durch *ZmP67*-Knockout

Aufgrund des offensichtlich chlorophylldefizienten Phänotyps der *P67*-Insertionslinien in Mais sollte die Expression von Komponenten des Photosystems auf Proteinebene geprüft werden. Stellvertretend für die Enzymkomplexe der ATPase, der Photosysteme I und -II sowie des Cytochrom-*b₆f*-Komplexes wurden die Kernuntereinheiten AtpB, PsaD, D1 bzw. PetD durch quantitative Western-Analyse mit den entsprechenden Antikörpern untersucht. Die relativen Proteinnengen wurden bestimmt und zwischen *ZmP67*-Insertionslinien und wildtypischen Kontrollpflanzen verglichen (s. Abb. 28). Die Ergebnisse zeigten die drastische Reduktion der β -Untereinheit der ATPase in den nichtkomplementierenden Kreuzungen der Insertionslinien (< 2 % des Levels wildtypischer Pflanzen). Dagegen waren die PsaD- bzw. D1-Komponenten des Photosystems I bzw. -II in den *P67*-Knockout-Pflanzen nur leicht reduziert bzw. unverändert. Die Proteinmengen der durch *petD* kodierten Untereinheit IV des Cytochrom-*b₆f*-Komplexes zeigten ein uneinheitliches Bild zwischen den analysierten Insertionslinien. Sowohl leicht reduzierte als auch unveränderte oder leicht erhöhte Proteinlevels wurden in den untersuchten *P67*-Mutanten beobachtet.

Die drastische Reduktion des ATPase-Enzymkomplexes in den *P67*-Insertionslinien kann die Erklärung für die Keimlingsletalität der Pflanzen liefern. Um die molekulare Ursache dieser Reduktion zu prüfen, ist die Northern-Analyse der plastidär kodierten Untereinheiten der ATPase geplant.

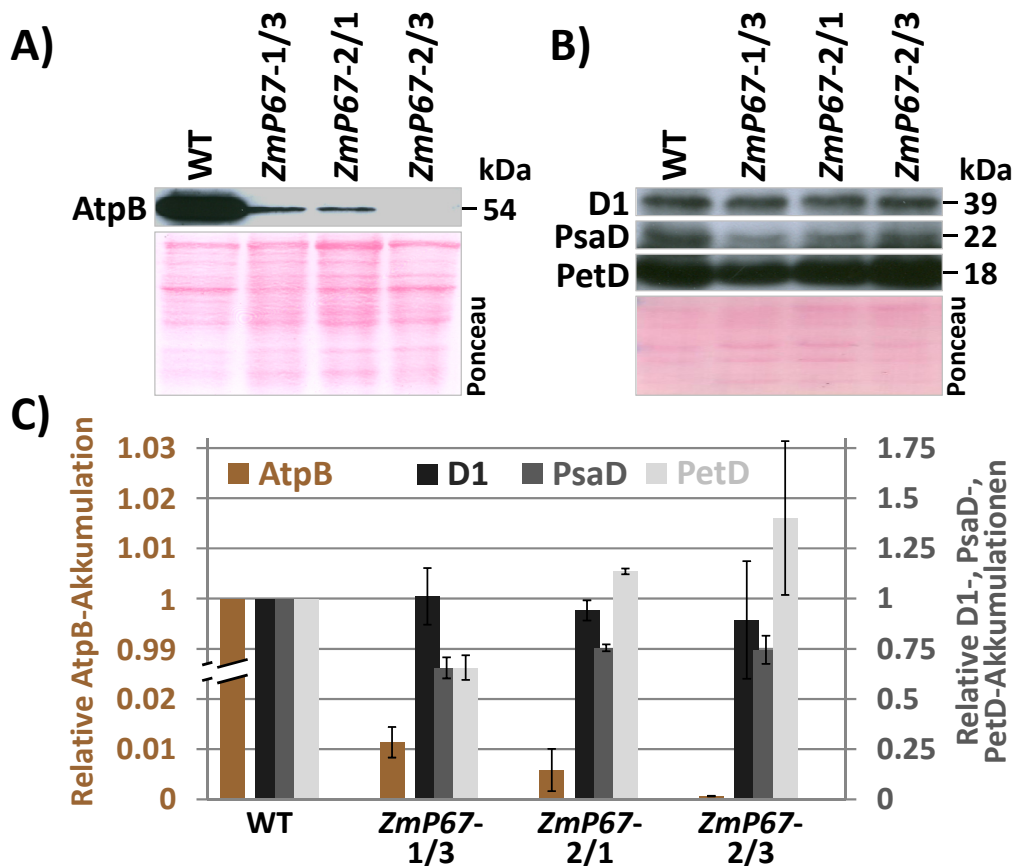


Abb. 28: Drastische Reduktion von AtpB in *ZmP67*-Knockout-Mutanten. Gesamtproteinextraktionen der Insertionslinien *ZmP67-1/3*, *-2/1* und *-2/3* (s. Abb. 22 und Abb. 24) sowie wildtypischer Kontrollpflanzen wurden durch Zentrifugation in lösliche und unlösliche Fraktionen separiert. A) Gleiche Proteinmengen der löslichen Fraktionen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembranen transferiert und für die Western-Analyse mit einem AtpB-spezifischen Antikörper eingesetzt. Die Ponceaufärbung der Membran sowie die Größe des Signals sind gezeigt. kDa = Kilodalton. B) Gleiche Proteinmengen der unlöslichen Fraktionen wurden wie in A) vorbereitet und für die Western-Analyse mit einem Gemisch aus D1-, PsaD- und PetD-spezifischen Antikörpern eingesetzt. Darstellung wie in A). C) Chemolumineszenzsignale von je zwei Western-Analysen (biologische Replikate, nicht gezeigt) wurden mit dem Lumi-Imager (Roche) detektiert und quantifiziert (Quantity-One-Software, Bio-Rad). Die Werte wurden jeweils auf die Wildtypkontrolle normalisiert und gegen den Genotyp der Pflanzen aufgetragen. Standardabweichungen sind als vertikale Linien dargestellt. AtpB- bzw. D1-, PsaD- und PetD-Werte sind gegen die primäre bzw. sekundäre Y-Achse aufgetragen. Zur geeigneten Darstellung der reduzierten AtpB-Level ist die primäre Y-Achse unterbrochen.

4 Diskussion

Die Dynamik der plastidären Genexpression wird zum Großteil durch posttranskriptionelle Prozesse bestimmt (Überblick in Bock, 2007). Die Akteure der RNA-Reifungsprozesse sind fast ausnahmslos kernkodiert und werden posttranslational in die Plastiden importiert. Eine große Proteinfamilie, deren Vertreter dabei zumindest in Landpflanzen omnipräsent sind, ist die der PPR-Proteine (zusammengefasst in Schmitz-Linneweber und Small, 2008). Eine Ausnahme unter den ansonsten kernkodierten RNA-Reifungsfaktoren stellt der putative, plastidär kodierte Spleißfaktor MatK dar (Mohr et al., 1993; Neuhaus und Link, 1987).

Mit MatK, dem einzigen Kandidaten für einen plastidär kodierten RNA-Reifungsfaktor, und P67, einem nukleär kodierten PPR-Protein, sind in der vorliegenden Arbeit zwei putative Proteine des plastidären RNA- (und/oder DNA-) Metabolismus charakterisiert worden.

4.1 MatK: Eine Maturase als polyspezifischer Spleißfaktor

Genetische und phylogenetische Indizien lassen eine Funktion von MatK beim Spleißen verschiedener plastidärer Gruppe-IIA-Introns vermuten. Genetische Hinweise kommen von den *Iojap*- und *Albostrians*-Mutanten in Mais und Gerste, deren plastidäre Translation defekt ist und die Spleißdefekte für Gruppe-IIA-Introns zeigen (Überblick in Jenkins et al., 1997; Vogel et al., 1999). Für diese Mutanten ist MatK der einzige Kandidat eines plastidär kodierten Proteins mit putativer Spleißfunktion. Daneben sind parasitische Pflanzen bekannt (*Cuscuta*-Arten der Untergattung *Grammica*), die im Rahmen einer allgemeinen evolutionären Reduktion ihrer Plastome neben *matK* auch verschiedene Gruppe-IIA-Introns verloren haben, was eine Abhängigkeit dieser Introns von einem MatK-Spleißfaktor vermuten lässt (Übersicht in Krause, 2008; McNeal et al., 2009). Überdies sind verschiedene Pflanzenarten mit freistehendem, nicht im Intron der tRNA^{Lys}(UUU) kodierten *matK*-ORF beschrieben (Funk et al., 2007; McNeal et al., 2009; Turmel et al., 2005; Wolf et al., 2003; Wolfe et al., 1992). Für diese Pflanzen, die kein plastidäres tRNA^{Lys}(UUU)-Intron beherbergen, liefert eine MatK-Funktion *in trans* die beste Erklärung für den Erhalt der Gensequenz. Damit wäre MatK eine Ausnahme unter den bisher untersuchten, in Gruppe-II-Introns kodierten, Maturasen, die lediglich

das Spleißen ihres Heimatintrons unterstützen. Ein direkter Beweis für eine Interaktion von MatK mit den entsprechenden Introns *in vivo* fehlte jedoch bislang.

In der vorliegenden Arbeit wurde MatK in einem transplastomischen Ansatz in Tabak stabil N- oder C-terminal mit dem HA-Epitop markiert (s. Abb. 6, S. 43). Die Epitopsequenz ermöglichte die Applikation hochreiner monoklonaler Antikörper für MatK-Immunopräzipitationen (s. Abb. 12, S. 49). Eine anschließende Analyse der copräzipitierten RNA zeigte erstmals, dass MatK *in vivo* spezifisch mit Transkripten assoziiert ist, die sieben der acht plastidären Gruppe-IIA-Introns in Tabak enthalten (s. Abb. 13, S. 50, Abb. 14, S. 51). Darunter finden sich die tRNA^{Lys}(UUU), die das *matK*-kodierende Intron beherbergt, drei weitere tRNAs (*trnV*-UAC, *trnI*-GAU, *trnA*-UGC), zwei Transkripte, die ribosomale Proteine kodieren (*rpl2*, *rps12*) sowie das proteinkodierende Transkript einer ATPase-Untereinheit (*atpF*). Dieser *In-Vivo*-Nachweis einer Assoziation von MatK mit den genannten Gruppe-IIA-Intron enthaltenden Transkripten ist in Übereinstimmung mit dem vermuteten MatK-Ziel-Spektrum (s.o.), wengleich Spleißdefekte für das Gruppe-IIA-Intron des *trnV*-Gens weder in *Iojap*- noch in *Albostrians*-Mutanten gezeigt sind (Jenkins et al., 1997; Vogel et al., 1999).

Lediglich das ebenfalls als Gruppe-IIA- klassifizierte zweite Intron der *clpP*-Vorläufer-RNA zeigte in keinem der drei alternativen Ansätze, die für den Nachweis copräzipitierter RNA verwendet wurden, eine Assoziation mit MatK (s. Abb. 13, Abb. 14, S. 50, S. 51). Das *clpP*-Intron 2 ist sowohl strukturell als auch phylogenetisch ein Außenseiter unter den plastidären Gruppe-IIA-Introns (McNeal et al., 2009; Michel et al., 1989; Turmel et al., 2005). Zu den Besonderheiten des *clpP*-Introns 2 im Vergleich mit den ursprünglich beschriebenen Charakteristika der Gruppe-IIA-Introns zählen z.B. Abweichungen in der terminalen Schleife der Subdomäne D3 in Domäne I (DI), das fehlende *bulged A* aber auch Divergenzen zu den Konsensussequenzen einer internen Schleife in DI (C1⁽ⁱⁱ⁾-C1⁽ⁱ⁾) und dem Intronende (Michel et al., 1989). Das *clpP*-Gen in Mais und Gerste ist intronlos, so dass eine Spleißdefizienz in den *Iojap*- und *Albostrians*-Mutanten nicht geprüft werden konnte (s.o.). Aus phylogenetischer Sicht ist das *clpP*-Intron 2 deutlich jünger als *matK* (McNeal et al., 2009; Turmel et al., 2005). Somit ist eine primäre Verknüpfung zwischen dem Spleißfaktor MatK und diesem Intron ausgeschlossen. Überdies ist das zweite *clpP*-Intron in einigen parasitischen Pflanzen erhalten und wird gespleißt (z.B. *Cuscuta gronovii*), obwohl keine *matK*-Sequenz auf dem Plastom kodiert

ist (Funk et al., 2007; McNeal et al., 2009). Zusammen mit der in dieser Arbeit gezeigten fehlenden Assoziation des entsprechenden Transkripts mit MatK in Tabak sprechen diese Hinweise dafür, dass das *clpP*-Intron 2 MatK-unabhängig gespleißt wird. Es ist wahrscheinlich, dass die strukturellen Unterschiede zwischen dem *clpP*-Intron 2 und den übrigen plastidären Gruppe-IIA-Introns bei der Erkennung durch den MatK-Spleißfaktor eine Rolle spielen.

Im Gegensatz zu monokotyledonen Pflanzen, wie Mais oder Gerste, ist die plastidäre Translation in Eudikotyledonen essentiell für die Zellentwicklung und ein gezielter *matK*-Knockout nicht möglich (Drescher, 2003; Schmitz-Linneweber und Small, 2008). Auch der in der vorliegenden Arbeit verfolgte Ansatz der Punktmutagenese zur Erzeugung hypomorpher, lebensfähiger *matK*-Mutanten führte lediglich zu transplastomischen Pflanzen, die den Selektionsmarker, nicht aber die Punktmutationen enthielten (s. Kap. 3.1.11, S. 67). Zusammen mit den genetischen und phylogenetischen Hinweisen (s.o.) suggerieren die in dieser Arbeit gezeigten Daten der MatK-RNA-Assoziation, dass MatK für den Spleißprozess essentieller, plastidärer RNAs benötigt wird und damit eine Mutagenese ausgeschlossen ist. Immerhin finden sich unter den MatK-Zielen die Transkripte von vier tRNAs und zwei ribosomalen Untereinheiten, deren Spleißdefekte damit höchstwahrscheinlich zum Knockout der Expression von insgesamt sechs Komponenten der Translation führen. Es ist bekannt, dass die Gene plastidärer tRNAs und ribosomaler Proteine essentiell für die Zellentwicklung in Tabak sind (Legen et al., 2007; Rogalski et al., 2008; Rogalski et al., 2006). Zusammengenommen sprechen diese Resultate für die Funktion von MatK als plastidär kodierter Spleißfaktor der sieben mit ihm assoziierten Gruppe-IIA-Introns. Ein endgültiger Funktionsnachweis könnte z.B. durch *In-Vitro*-Komplementationen von spleißinkompetenten Stromafraktionen der *Io-jap*- oder *Albostrians*-Mutanten mit heterolog exprimiertem MatK erfolgen.

Somit kann MatK als ein Beispiel für eine Gruppe-II-Intron-Maturase dienen, die die strikte Verknüpfung bakterieller Maturasen mit dem Heimatintron verlassen hat und nun mehrere Introns als Spleißfaktor bedient (Lambowitz und Zimmerly, 2004). Allein unter den Gruppe-I-Intron-Maturasen ist ein Vertreter beschrieben (bI4-Maturase), dessen Expression essentiell für den Spleißprozess von zwei Introns ist (Labouesse et al., 1984). Daneben sind in Landpflanzen freistehende, kernkodierte Proteine mit Maturase-Homologie beschrieben, die posttranslationell in die Mitochondrien importiert werden und

von denen ein Vertreter das Spleißen mehrerer Introns unterstützt (Keren et al., 2009; Mohr und Lambowitz, 2003).

Aufgrund von Ähnlichkeiten in Struktur und Spleißprozess wird angenommen, dass Gruppe-II-Introns die Vorläufer der spleißosomalen Introns im Kern sind und möglicherweise durch die eubakteriellen Endosymbionten eingeschleppt wurden (z.B. Cech, 1986; Sharp, 1991; Toor et al., 2008). Aus der Existenz einer polyspezifischen Gruppe-II-Intron-Maturase (MatK) ergeben sich somit interessante mögliche Implikationen für evolutionäre Übergänge zwischen den Spleißprozessen der Gruppe-II- und der spleißosomalen Introns. Die in den Kerngenomen der Eukaryoten vorkommenden spleißosomalen Introns werden mit Hilfe des Spleißosoms, eines großen Ribonukleoproteinkomplexes (RNPs), gespleißt (Übersicht z.B. in Wahl et al., 2009). Dagegen kodieren bakterielle Gruppe-II-Introns spezialisierte Maturasen, die spezifisch den Spleißprozess ihres Heimatintrons unterstützen (Übersicht in Lambowitz und Zimmerly, 2004). Der evolutionäre Übergang von den hochspezifischen, Maturase-abhängigen Gruppe-II-Introns der Bakterien zur komplexen, *in trans* agierenden Spleißmaschinerie der Spleißosomen ist unverstanden, nicht zuletzt aus Mangel an „lebenden Fossilien“ mit Übergangsstadien zwischen diesen beiden Zuständen. MatK könnte als Modell für den Übergang von Maturasen als hochspezifische Spleißfaktoren hin zu mehr oder weniger ausgeprägten Generalisten dienen (Matsuura et al., 2001). Die Funktion einer Maturase als genereller Spleißfaktor kann damit aufzeigen, wie die Ausbreitung und Diversifizierung von Gruppe-II-Introns im Kern durch eine Spleißmaschinerie begleitet werden konnte, die multiple Ziele bedient. So könnten zumindest initial modifizierte Gruppe-II-Intron-Maturasen, die durch die invasiven Introns kodiert waren, die Funktion eines Protospleißosoms wahrgenommen haben. Damit kann ein Verständnis der MatK-Funktion beim Spleißen multipler Introns auch dazu beitragen, die *in trans* agierenden Proteinkomponenten des Spleißosoms besser zu verstehen.

4.2 MatK assoziiert mit multiplen Intronbereichen

Um die MatK-Bindestellen im *trnK*-Heimatintrons detaillierter charakterisieren zu können, wurde copräzipitierte RNA durch RIP-Chip-Analysen mit Hilfe eines *trnK*-Oligonukleotid-*Tiling-Arrays* untersucht (s. Abb. 15, S. 53). Die Protektion von RNA-Bereichen vor RNasen des Stromaextrakts durch das RNA-Bindeprotein erlaubt dabei eine

Einengung der Bindestellen. Eine analoge Methode wurde bereits erfolgreich für die Feinkartierung der Bindepitionen anderer RNA-Bindeproteine verwendet (z.B. Pfalz et al., 2009; Schmitz-Linneweber et al., 2006). Die Degradation des *trnK*-Vorläufertranskripts und damit die Möglichkeit der Auflösung der Bindestellen wurde durch Northern-Analysen bestätigt (Abb. 15, S. 53). Die Auswertung der RIP-Chip-Analysen zeigte die differentielle Anreicherung nahezu aller Intronomänen. Lediglich der *matK*-ORF, Domäne V (DV), Teile von Domäne VI (DVI) sowie die *trnK*-Exonsequenzen zeigten keine differentielle Anreicherung in MatK-Immunopräzipitationen (s. Abb. 29 bzw. Abb. 15, S. 53). Diese Ergebnisse legen eine zeitlich oder räumlich multiple Assoziation von MatK mit den *trnK*-Intronomänen I, II, III (DI, DII, DIII), dem 3'-Ende der Domäne IV (DIV) und Teilen von Domäne VI (DVI) während des Spleißprozesses nahe. Zusammenfassend lassen sich demnach MatK-Kontakte mit Intronsequenzen stromauf- und -abwärts des *matK*-ORFs, nicht aber im Leserahmen selbst erkennen. Diese Daten korrelieren auch mit den initialen RIP-Chip-Experimenten, die zwei Maxima der Anreicherung in Intronsequenzen, nicht aber in der dazwischen liegenden *matK*-Sequenz zeigten (s. Abb. 13, S. 50). Interessanterweise beinhaltet auch die Interaktionsfläche der detailliert charakterisierten bakteriellen Maturase LtrA mit ihrem Heimatintron zahlreiche Kontakte in DI und DII (Dai et al., 2008), die ebenfalls im *trnK*-Intron in weiten Bereichen mit MatK assoziiert sind (s. Abb. 29 bzw. Abb. 15, S. 53). Dies lässt die Vermutung zu, dass die Position der Maturase MatK am gefalteten Intron zumindest teilweise evolutionär konserviert ist.

Den Maximalwert der differentiellen Anreicherung erreicht die Sonde *trnK* 11, welche die Grenzregion von DI/II repräsentiert (s. Abb. 29 bzw. Abb. 15, S. 53, +HA/-HA = 11, p-Wert < 10^{-4}). Diese Sonde deckt die Regionen (i) und (ii) sowie die terminale Schleife von DII und die Regionen (i) und (ii) der DI ab (Tabelle S2 in Zoschke et al., 2010). Plateaus mit hohen Anreicherungsdaten beinhalten die Sonden *trnK* 2 - 7 bzw. 9 und *trnK* 12 - 15, welche in DI und DIII lokalisiert sind (+HA/-HA $\geq \sim 6$, p-Werte < 5×10^{-4}). Daneben zeigen die Sonden *trnK* 39/40 bzw. 42 und 44, die die Endregionen der Domänen IV bzw. V und VI repräsentieren, hohe bzw. mittlere Anreicherungsdaten (+HA/-HA $\geq \sim 7$ bzw. ~ 5 ; p-Werte < 8×10^{-4}). Alle genannten Sonden sind in Intron-Regionen lokalisiert, die strukturelle Unterscheidungsmerkmale der Intron-Untergruppen IIA und IIB enthalten (Michel et al., 1989; Qin und Pyle, 1998). Im Einzelnen sind

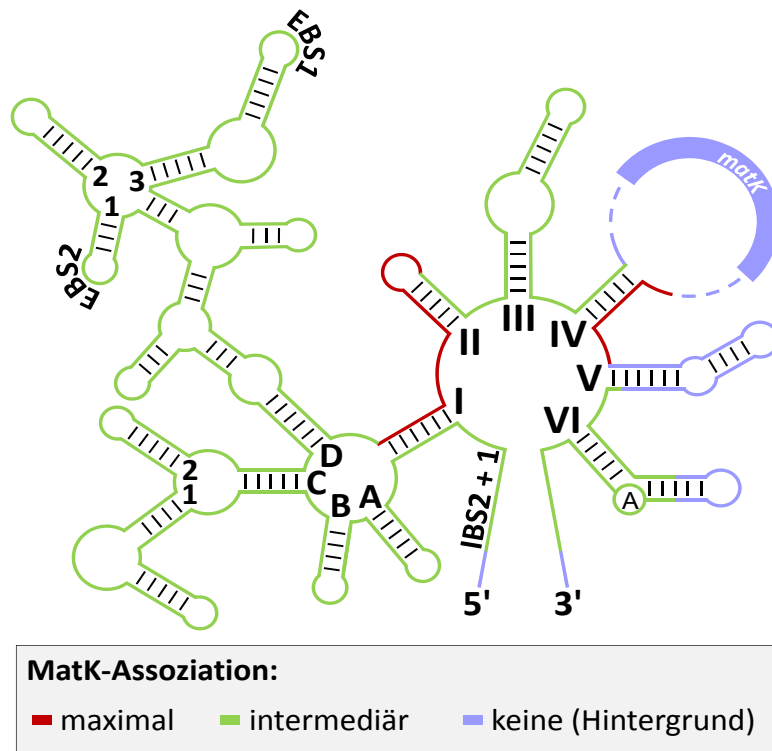


Abb. 29: Grafisches Modell der MatK-Bindestellen im *trnK*-Intron basierend auf den in RIP-Chip-Analysen identifizierten Assoziationen (s. Abb. 15, S. 53). Gezeigt sind die farbkodierten Anreicherungswerte der RIP-Chip-Analyse entsprechend der Position der Sonden in der schematisierten Sekundärstruktur des *trnK*-Introns (Intronstruktur vereinfacht nach Hausner et al., 2006; Michel et al., 1989). Farbkodierung der Anreicherung: rot = maximal, grün = intermediär, blau = keine (Wertetabelle in Zoschke et al., 2010). Die Introndomänen I - VI sowie die Subdomänen der ersten (A - D) und zweiten Ebene (1 - 2 bzw. 1 - 3) in Domäne I und das *bulged A* sind indiziert. EBS/IBS = *Exon-/Intron-binding sites*. Der *matK*-ORF ist gezeigt.

dies die *Exon-binding site 1* (EBS1), die Subdomänen (i) und (ii) der DI, die DI/DII-Verbindungsnukleotide sowie die Grenzregion zwischen den Domänen IV und V. Daneben ist interessant, dass die signifikanteste differentielle Anreicherung mit der Sonde *trnK* 9 erreicht wurde ($p\text{-Wert} = 3,6 \times 10^{-6}$), welche die terminale Schleife der Subdomäne D3 in Domäne I abdeckt. Diese Region sowie die ebenfalls differentiiell angereicherte interne Schleife in DI ($C1^{(ii)}$ - $C1^{(i)}$) und das Intronende zeigen spezifische Unterschiede zwischen dem *clpP*-Intron 2 und den restlichen Gruppe-IIA-Introns (Michel et al., 1989). Zusammen können spezifische Kontakte in diesen Regionen erklären, wie MatK zwischen den Introns der Untergruppen IIA und IIB und innerhalb der Gruppe-IIA-Introns zwischen seinen Ziel-Introns und dem *clpP*-Intron 2 unterscheidet und die beobachtete Spezifität erreicht.

Eine höhere, nukleotidgenaue Auflösung der MatK-Bindestelle könnte in künftigen Untersuchungen mit *In-Vitro*-Analysen erreicht werden, wie sie für die Aufklärung von Bindungen der bakteriellen LtrA-Maturase im L1.LtrB-Intron oder des plastidären CRS1-Spleißfaktors im *atpF*-Intron erfolgreich eingesetzt wurden (Dai et al., 2008; Matsuura et al., 2001; Ostersetzer et al., 2005). Daneben würden derartige Untersuchungen eindeutig klären, inwieweit die in dieser Arbeit charakterisierten MatK-RNA-Assoziationen im *trnK*-Intron durch direkte Kontakte oder durch zusätzliche Faktoren zustande kommen. Tatsächlich ist von den kernkodierten Spleißfaktoren OTP51, WTF1 und RNC1 bekannt, dass sie am Spleißprozess des *trnK*-Introns beteiligt sind und damit mit MatK und/oder dem *trnK*-Intron interagieren könnten (de Longevialle et al., 2008; Kroeger et al., 2009; Watkins et al., 2007). Somit könnte RNA aus den Pelletfraktionen von MatK-Immunopräzipitationen über Protein- oder RNA-Protein-Interaktionen mit diesen Spleißfaktoren copräzipitiert worden sein. Da allerdings von anderen Maturasen bekannt ist, dass sie direkt RNA binden (z.B. Huang et al., 2003; Matsuura et al., 2001), ist auch für MatK eine unmittelbare RNA-Bindung in den entsprechenden Regionen des *trnK*-Introns die einfachste Erklärung für die beobachteten Assoziationen.

Eine weitere Einschränkung der MatK-*trnK*-Bindestellen-Analyse ergibt sich aus der fehlenden zeitlichen Auflösung. Es ist wahrscheinlich, dass die immunopräzipitierten MatK-RNPs eine Mischung verschiedener MatK-RNA-Assoziationen repräsentieren, die während unterschiedlicher Schritte des Spleißprozesses auftreten. Die beobachteten Kontakte müssen demnach nicht zwangsläufig zeitlich parallel während des Spleißprozesses auftreten, sondern könnten sequentiell ablaufende Spleißschritte darstellen. Tatsächlich sind dynamische Funktionen der bakteriellen LtrA-Maturase beim Spleißprozess ihres Heimatintrons vorgeschlagen worden (Dai et al., 2008; Rambo und Doudna, 2004). Überdies kann die *Array*-Analyse im Bezug auf Intronsequenzen nicht zwischen freiem Intron und Vorläufertranskript sowie im Bezug auf Exonsequenzen nicht zwischen reifem Transkript und Vorläufer unterscheiden. Inwieweit MatK auch die Exonbereiche des Vorläufers bindet oder nach dem Spleißprozess noch am freien Intron gebunden ist, ließe sich effizient durch *In-Vitro*-Analysen prüfen.

Insgesamt unterstützen die Daten ein Modell, in dem MatK räumlich und/oder zeitlich multiple Kontakte mit seinem *trnK*-Ziel-Intron eingeht, woraus sich eine große Interaktionsfläche ableitet. Diese ausgeprägte Protein-RNA-Interaktion könnte der evolutio-

nären Anpassung des MatK-Spleißfaktors an verschiedene Introns dienlich gewesen sein, indem verschiedene Kontaktpunkte für den Spleißprozess der einzelnen Introns genutzt werden konnten (Matsuura et al., 2001). Aufschlüsse darüber kann die Analyse von Gemeinsamkeiten und Unterschieden in den Bindungen zwischen MatK und seinen Ziel-RNAs geben. Dem können RIP-Chip-Analysen mit Oligonukleotid-*Tiling-Arrays* für die verbleibenden MatK-Ziele dienen, die analog zu den gezeigten Untersuchungen der MatK-*trnK*-Interaktionen ausgeführt werden. Daneben sind aber auch *In-Vitro*-Bindestudien zur Aufklärung der MatK-Intron-Interaktionen denkbar. Insbesondere ein Abgleich mit den bekannten Bindestellen des CRS1-Spleißfaktors im *atpF*-Intron könnte Hinweise darauf geben, welche spezialisierten und/oder generalisierten Funktionen den plastidären Spleißfaktoren beim Spleißprozess der Introns zukommen.

4.3 MatK und das plastidäre „Spleißosom“

Mit einem MatK-Spleißfaktor wird dem komplexen Spleißapparat plastidärer Introns eine weitere, allerdings plastidär kodierte Komponente hinzugefügt (s. Abb. 2, S. 5). Bislang ist für jedes der plastidären Introns in Angiospermen mindestens ein kernkodierter Spleißfaktor beschrieben worden (Übersicht in Kroeger et al., 2009). Für einige Introns sind fünf essentielle Spleißfaktoren bekannt, so dass die entsprechenden RNPs gleichviel Protein und RNA enthalten (Kroeger et al., 2009). Damit hat der plastidäre Spleißapparat in Aufbau und Komplexität außer einer Maturase und der Klassifizierung der meisten Introns als Gruppe-II-Introns kaum Gemeinsamkeiten mit dem der Bakterien, deren Spleißprozesse von hochspezifischen, intronkodierten Proteinen realisiert werden (Lambowitz und Zimmerly, 2004). Erklären lässt sich diese Komplexität durch die Akquisition von RNA-bindenden Proteinen des „Wirts“ und deren (Um-) Nutzung als Spleißfaktor und/oder die Entstehung neuer RNA-bindender Domänen im Kerngenom während der Evolution von einer endosymbiotischen Gemeinschaft zur heutigen Pflanzenzelle (Kroeger et al., 2009). Für diese Szenarien sprechen die Exklusivität und die massive Expansion bestimmter RNA-Bindedomänen in Pflanzen (CRM-Domäne, Barkan et al., 2007; PORR-Domäne, Kroeger et al., 2009; PPR-Domäne, Schmitz-Linneweber und Small, 2008).

Die MatK-Ziel-RNAs *trnK*-UUU, *trnV*-UAC, *trnI*-GAU, *trnA*-UGC, *rpl2*, *rps12* bzw. *atpF* werden in Mais von zwei bzw. drei weiteren essentiellen Spleißfaktoren bedient

(WTF1, RNC1 bzw. CRS1; Jenkins et al., 1997; Kroeger et al., 2009; Watkins et al., 2007). Daneben bedienen das Maisprotein WHY1 *atpF* und das *Arabidopsis*-Protein OTP51 *trnV*-UAC, *trnK*-UUU und *atpF* als akzessorische, nichtessentielle Spleißfaktoren (de Longevialle et al., 2008; Prikryl et al., 2008). Inwieweit weitere Faktoren im „MatK-Spleißosom“ enthalten sind, kann in Zukunft durch massenspektrometrische Analysen MatK-assoziiierter Proteine untersucht werden. Ein analoger Ansatz mit den bekannten Spleißfaktoren CRS1, CAF1 und CAF2 führte zur Identifikation von neuen, bis dahin unbekanntem Faktoren der plastidären Spleißmaschinerie in Mais (WTF1, WHY1, RNC1; Kroeger et al., 2009; Prikryl et al., 2008; Watkins et al., 2007). Eine initiale massenspektrometrische Untersuchung MatK-copräzipitierter Proteine aus Tabak und ein erster Abgleich mit *Arabidopsis*-Datenbanken wurde in Kooperation mit Dr. Waltraud Schulze (MPI/Golm) ausgeführt. Dabei wurden zwei PPR-Proteine als potentielle Kandidaten weiterer Faktoren des „MatK-Spleißosoms“ identifiziert (NCBI-Akzessionen: At5g15980, At3g48810). Weitere Analysen sind nötig, um dieses Resultat zu verifizieren. Insbesondere die Identifikation von Tabak-Homologen der bekannten Spleißfaktoren der Gruppe-IIA-Introns aus *Arabidopsis*/Mais (OTP51/WTF1, RNC1) wäre als Kontrolle der Methodik wünschenswert. Daneben sollte ein Abgleich der Daten mit Tabak-EST-Sequenzen zur Identifikation weiterer Proteine führen.

Beachtlich ist nicht nur die Komplexität sondern auch die Dynamik der Zusammensetzung des plastidären „Spleißosoms“. In Analogie zum nukleären Spleißosom, das je nach Ziel-Intron in Komposition und Struktur variieren kann (Zusammengefasst in Wahl et al., 2009), lassen die bisher analysierten plastidären Spleißfaktoren mit ihren spezifischen, z.T. überlappenden Spektren an Ziel-Introns eine vergleichbare Dynamik in der Zusammensetzung des plastidären „Spleißosoms“ vermuten (s. Abb. 2, S. 5). Zumindest für einen der bekannten Faktoren (CRS1) ist die direkte RNA-Bindung belegt (Ostersetzer et al., 2005). Weitere vier Spleißfaktoren besitzen wie CRS1 CRM-Domänen (s. Abb. 2, S. 5), für die eine RNA-Bindung gezeigt ist (Keren et al., 2008). Sofern es sich bei den übrigen Spleißfaktoren des plastidären „Spleißosoms“ auch um direkt RNA-bindende Proteine handelt, muss man jeweils von spezifischen, distinkten Bindestellen innerhalb der Vorläufer-RNA ausgehen. Die Bindestellenspezifität der einzelnen Spleißfaktoren ist bisher aber kaum untersucht (Ausnahmen: MatK, s. Abb. 29 bzw. Abb. 15, S. 53; CRS1, Ostersetzer et al., 2005). Bedenkt man, dass sowohl Spleiß-

faktoren mit exklusiver Gruppe-IIA- oder -IIB-Intronspezifität als auch solche mit überlappenden Spektren an Ziel-Introns beschrieben sind (s. Abb. 2, S. 5), könnte die Kenntnis der jeweiligen Bindestellen interessante Aufschlüsse über strukturelle, *in vivo* relevante Unterschiede und/oder Gemeinsamkeiten innerhalb der Intron-Untergruppen geben. Sofern alle essentiellen Spleißfaktoren eines Introns identifiziert sind, kann auch die Etablierung eines *In-Vitro*-Spleißsystems neue Aufschlüsse über die räumliche und zeitliche Anordnung und die Funktionen der RNA- und Proteinkomponenten im RNP während der Spleißprozesse geben.

Vor dem Hintergrund einer Membranbindung der phagenähnlichen Transkriptionsenzyme in „reifen“ Chloroplasten in Spinat (RpoTp, RpoTmp, Azevedo et al., 2006, 2008) und der membranassoziierten Translation zumindest der Untereinheiten des Photosystems II (z.B. Margulies et al., 1987; Uniacke und Zerges, 2007; Yamamoto et al., 1981) ist auch die Frage nach der suborganellären Lokalisation des „MatK-Spleißosoms“ von Interesse, da die Spleißprozesse der Transkription und der Translation zwischengeschaltet sind. Aufgrund putativer Transmembran-Helices im *matK*-ORF wurde eine membranassoziierte Lokalisation des Proteins vorgeschlagen (Barthet und Hilu, 2007a). Dementgegen zeigten die Western-Analysen der vorliegenden Arbeit die Lokalisation von MatK in den löslichen Anteilen chloroplastidärer Fraktionen, so dass eine Membranassoziation unwahrscheinlich ist (s. Abb. 10, S. 46). Auch für die plastidären Spleißfaktoren RNC1, WTF1 bzw. CRS1, die für den Spleißprozess aller bzw. ausgewählter MatK-Ziele essentiell sind (s. Abb. 2, S. 5), wurde die Lokalisation im Stroma nachgewiesen (Kroeger et al., 2009; Till et al., 2001; Watkins et al., 2007). Lediglich WHY1, ein akzessorischer Spleißfaktor des *atpF*-Introns kolokalisiert in Stroma- und Thylakoidfraktionen, wobei die Verortung in den Thylakoiden indirekt durch die DNA-Bindung des Proteins vermittelt wird (Prikryl et al., 2008). Insgesamt sprechen die Daten somit für die Lokalisation des MatK-enthaltenden „Spleißosoms“ im Stroma.

4.4 MatK-Expression: Regulative Implikationen

Eine interessante evolutionäre Frage, die sich für alle organellär kodierten Proteine stellt, ist die nach dem Grund der Konservierung im Organellengenom. Als Ursache für den Erhalt plastidärer Gene wurden unter anderem membranbedingte Transporthemmnisse, die Toxizität im Zytoplasma, die Notwendigkeit der kotranslationellen Assemblierung

rung sowie regulative Erfordernisse vorgeschlagen (Übersicht z.B. in Allen, 2003; Barbrook et al., 2006). Im Bezug auf *matK* könnten zwei regulative Aspekte eine Rolle gespielt haben. (i) Zum einen könnte MatK als ein Stellglied der plastidären Genexpression dienen, dessen präzise Regulation in Anpassung an die Bedürfnisse des einzelnen Chloroplasten essentiell ist. Somit wäre eine Kodierung auf dem Plastom erforderlich. Tatsächlich sind sechs der sieben Ziel-Introns von MatK in tRNAs oder Genen ribosomaler Proteine lokalisiert, so dass eine regulative Funktion des MatK-abhängigen Spleißens für die plastidäre Genexpression denkbar ist. (ii) Zum anderen könnte ein möglicher Autoregulationsmechanismus, wie er für die bakterielle Maturase LtrA beschrieben ist (Singh et al., 2002), den Verbleib des *matK*-Gens auf dem Plastom nötig gemacht haben. Die Bindung der LtrA-Maturase an eine kleine Stammschleife ihrer mRNA, die das Startcodon und die Shine-Dalgarno-Sequenz enthält, erlaubt die Autoregulation der Expression durch Translationsinhibition. Diese Art der Regulation ist aber für einen kernkodierte Spleißfaktor wegen der räumlichen Trennung von Transkription (Kern), Translation (Zytoplasma) und Spleißen (Chloroplast) kaum umsetzbar. Autoregulationsmechanismen der Translation sind in der Kontrolle der plastidären Genexpression weit verbreitet (z.B. Choquet et al., 1998; Wostrikoff et al., 2004; Wostrikoff und Stern, 2007).

4.4.1 MatK: Ein Regulator der plastidären Genexpression?

Regulative Implikationen der MatK-Expression können unter anderem durch eine Analyse der Expression von MatK und seinen Ziel-RNAs im Verlauf der Pflanzenentwicklung untersucht werden. Die entwicklungsabhängige Expression des MatK-Proteins wurde durch Western-Analyse in epitopmarkierten transplastomischen Pflanzen analysiert. Der Altersverlauf der MatK-Akkumulation zeigte eine zweigipflige Kurve mit Maxima in 7 und 18 Tage alten Keimlingen und Pflanzen (s. Abb. 11, S. 48). Insgesamt findet sich eine starke Akkumulation des Proteins in jungen, grünen Organen. Sowohl in älteren, grünen Organen als auch in nichtgrünen Organen ist MatK lediglich in geringen Mengen oder nicht nachweisbar. Dieses Expressionsmuster lässt vermuten, dass MatK eine wichtige Rolle in der frühen Chloroplastenentwicklung spielt, während geringe Mengen des Proteins ausreichen, um die Genexpression in älteren Pflanzenteilen aufrecht zu erhalten. Eine solche Funktion ist auch für plastidäre RNA-Polymerasen postu-

liert worden, deren Menge und Aktivität in jungem Gewebe deutlich höher sind als in älterem (Demarsy et al., 2006). Eine MatK-Funktion bei der Chloroplastenbiogenese ergibt sich wahrscheinlich aus dem Zielspektrum dieses Spleißfaktors (tRNAs sowie Transkripte ribosomaler Untereinheiten). Der zweigipflige Verlauf der MatK-Akkumulation mit Maxima in sieben und 18 Tage alten Pflanzen könnte sich durch einen Wechsel in der Blattzusammensetzung bei der Entwicklung von Keimlingen zu jungen Pflanzen erklären (Demarsy et al., 2006). So kann eine Alterung der Keimblätter den Abfall der MatK-Levels von sieben zu elf Tage alten Keimlingen erklären, sofern diese Alterung mit einem Abbau der MatK-Proteine einhergeht. (s. Abb. 11, S. 48). 18 Tage alte Pflanzen werden bereits durch die Blattmasse junger Primärblätter dominiert, was zu einem zweiten MatK-Maximum führen könnte. Mit fortschreitendem Wachstum der Pflanze sinkt der Anteil junger Blätter ab. Dies kann eine fortgesetzte Reduktion der MatK-Mengen bedingen. Der Anstieg in den MatK-Akkumulationen der Achselknospen in älteren Pflanzen ist möglicherweise durch deren Remeristematisierung vor dem Austreiben bedingt.

Die Akkumulation der MatK-Ziel-RNAs wurde durch Northern-Analysen geprüft (s. Abb. 18, S. 65). Die *matK*-Sequenz selbst ist im Intron des *trnK*-Gens lokalisiert. Ob als Matrize der Translation des MatK-Proteins der *trnK*-Vorläufer, das freie Intron oder ein schwach exprimiertes, separates *matK*-Transkript genutzt wird, ist nicht bekannt (Vogel et al., 1997). Jene *trnK*-Intron enthaltenden RNAs, die der Größe nach als *Template* der *matK*-Translation in Frage kommen, zeigen eine maximale Akkumulation in 25 Tage alten Pflanzen, in sieben Tage alten Keimlingen sind sie dagegen kaum nachweisbar (s. Abb. 18, S. 65). Vergleicht man also die MatK-Mengen mit der Akkumulation der potentiellen *matK*-Translations-*Templates*, so ist keine simple Korrelation zwischen erst- und letztgenannten zu erkennen, wie sie von Barthelet et al. (2007b) vermutet wurde (s. Abb. 11, S. 48 und Abb. 18, S. 65). Diese mangelnde Korrelation zwischen Transkript- und Proteinakkumulation spricht für eine translationskontrollierte MatK-Expression. Die Translationsregulation ist ein Charakteristikum der plastidären Genexpression (Choquet und Wollman, 2002). Der Nachweis der für die MatK-Translation genutzten Transkripte ist durch Analysen Polysomen-gebundener RNA möglich.

Interessanterweise findet sich ebenso keine Korrelation zwischen der Akkumulation der übrigen MatK-Ziel-RNAs (intronhaltige Vorläufer) und der von MatK. Lediglich zu Be-

ginn der Pflanzenentwicklung bzw. in den Achselknospen (3 d - 11 d bzw. 38 d - 59 d) ist die erwartete Korrelation, von abnehmenden Ziel-RNA-Mengen mit zunehmenden MatK-Mengen (und entgegengesetzt) zu erkennen. Daraus lässt sich ableiten, dass die MatK-Akkumulation in diesen Altersstufen limitierend für den Spleißprozess sein könnte. Somit ist eine MatK-abhängige regulative Funktion des Spleißens zu Beginn der Chloroplastenentwicklung möglich. Einschränkend muss aber hinzugefügt werden, dass die stellvertretend für die proteinkodierenden MatK-Ziel-RNAs untersuchten Proteine Rps5 und AtpB in der Entwicklung früher akkumulieren als die entsprechenden reifen Transkripte (*rpl2*, *rps12*, *atpF*, s. Abb. 18, S. 65, Abb. 19, S. 66). Dies spricht für eine überwiegende Expressionsregulation dieser Gene auf Translationsebene. Somit könnte der Spleißprozess für diese MatK-Ziele nur bedingt regulierend wirken. Dennoch ist eine regulative Funktion des MatK-abhängigen Spleißens für die tRNA-Ziele denkbar.

Weitere Variablen, die bei den gezeigten Analysen noch unberücksichtigt blieben, sind die Zu- bzw. Abflüsse in bzw. aus den entsprechenden RNA-Pools durch Transkription bzw. Degradation. *Run-On*-Transkriptions- bzw. *In-Vitro*-Degradations-Analysen können zur Bestimmung des Einflusses dieser Größen genutzt werden (z.B. Klaff, 1995; Zoschke et al., 2007). In den 18 und 25 Tage alten Pflanzen finden sich für alle MatK-Ziele hohe Levels an intronhaltigen Vorläufer-RNAs. Gleichfalls wurden mittlere Akkumulationen von MatK beobachtet. Dies kann bedeuten, (i) dass der Spleißapparat durch hohe Transkriptionsraten mit Vorläufertranskripten übersättigt wird. (ii) Daneben ist es möglich, dass andere Faktoren als MatK den Spleißprozess limitieren. Dabei ist von Interesse, dass WTF1 und RNC1, die als Spleißfaktoren auch alle MatK-Ziel-RNAs bedienen (Kroeger et al., 2009; Watkins et al., 2007), daneben unter anderem für den Spleißprozess der Gruppe-IIB-Intron enthaltenden *trnG*-UCC essentiell sind. Eine Limitierung des Spleißprozesses durch WTF1 oder RNC1 könnte somit erklären, weshalb das Akkumulationsverhalten der *trnG*-Transkripte mit dem der MatK-tRNA-Ziele nahezu identisch ist (s. Abb. 18, S. 65). (iii) Überdies könnten die Ziel-RNAs nicht zugänglich für den Spleißapparat sein, z.B. durch Konkurrenz der Bindestellen mit anderen RNA-bindenden Proteinen.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die gezeigten Analysen kaum Hinweise darauf geben, dass MatK regulative Funktionen in der plastidären Genexpression aus-

übt, wobei weitere Untersuchungen nötig sind, um dieses Resultat zu verifizieren. Eine höhere zeitliche Auflösung, z.B. durch Bestimmung der Transkript- und Proteinmengen während des Tag-Nacht-/Licht-Dunkel-Rhythmus, bzw. die Beeinflussung des Systems durch Stress (z.B. Licht, Temperatur) könnten einen weiteren Erkenntnisgewinn über denkbare regulative Funktionen des MatK-abhängigen Spleißens ermöglichen. Neben diesen Experimentalansätzen ist auch eine systembiologische Annäherung zur Analyse möglicher regulativer Einflüsse der MatK-Expression und einer denkbaren Autoregulation der Expression der Maturase in Kooperation mit Dr. Ilka Axmann (Institut für Theoretische Biologie, HU Berlin) initiiert worden.

4.4.2 MatK und seine mögliche Autoregulation

Zusätzlich zu diesen weitestgehend indirekten Analysen einer möglichen Autoregulation (s. Kap. 4.4.1) erfolgte die Untersuchung auch analog zum Nachweis der Regulations-schleife für die bakterielle LtrA-Maturase. Im *Lactococcus* L1.LtrB-Intron befindet sich die Hauptbindestelle der intronkodierte LtrA-Maturase in der kleinen Subdomäne DIVa der DIV, die das Startcodon und die Shine-Dalgarno-Sequenz des Maturasetranskripts enthält (Wank et al., 1999). Die Bindung von LtrA an diese Subdomäne stellt den ersten Kontakt der Maturase zu ihrem Heimatintron her, beeinflusst die Spleißeffizienz und spielt eine Rolle beim *Retrohoming* (Cui et al., 2004; Matsuura et al., 2001). Daneben repräsentiert diese Interaktion in einer Autoregulationsschleife die *LtrA*-Translation und sorgt damit für eine adäquate Expression der Maturase (Singh et al., 2002). Ähnliche, das *matK*-Startcodon enthaltende, Stammschleifen finden sich auch in den *trnK*-Intronsequenzen von Pflanzen, was einen vergleichbaren Autoregulationsmechanismus vermuten lässt (s. Abb. 16, S. 55). Deswegen wurde die mögliche Translationsinhibition durch MatK-Bindung an diese Stammschleife in einem heterologen Expressionssystem untersucht, das aus den Analysen des LtrA-Autoregulationsmechanismus adaptiert wurde (Singh et al., 2002; Zoschke et al., 2009). Dabei wird der Einfluss der MatK-Expression auf Reportervektoren geprüft, deren *lacZ*-Translation unter der Kontrolle der putativen *matK*-Autoregulationssequenz steht (s. Abb. 17, S. 56). Die Koexpression in *E. coli* zeigte jedoch keinen Einfluss der MatK-Expression auf die *lacZ*-Aktivität der Reportervektoren, wie sie in einem analogen Ansatz für LtrA von Singh et al. (2002) beobachtet wurde (s. Abb. 17, S. 56). Dies kann bedeuten, dass die MatK-Translation

nicht autoreguliert ist. Daneben sind Fehlerquellen in diesem heterologen Expressionssystem möglich, die in weiteren Analysen durch entsprechende Kontrollen ausgeschlossen werden müssen. So könnte das heterolog exprimierte MatK-Protein nicht funktionell sein, was durch *In-Vitro*-Bindestudien geprüft werden kann. Ferner ist nicht klar, wieviel MatK-Protein im Verhältnis zur Reporter-RNA benötigt wird, um eine Translationsrepression zu beobachten. So könnte ein Überschuss an Reporter-RNA dazu geführt haben, dass keine Translationsinhibition beobachtet wurde. Quantifizierungen der Komponenten können diesen Umstand klären. Auch die Notwendigkeit weiterer (Spleiß-)Faktoren für eine korrekte MatK-Bindung kann nicht ausgeschlossen werden (s. Kap. 4.2 und 4.3).

Die genannten Fehlerquellen können durch einen Wechsel von den gezeigten heterologen Analysen zu *In-Planta*-Untersuchungen einer möglichen Autoregulation umgangen werden. So wurden bereits in der vorliegenden Arbeit transplastomische Pflanzen erzeugt, die die putative Autoregulationsbindestelle ektopisch überexprimieren (s. Kap. 3.1.11). Die Konkurrenz dieser ektopisch überexprimierten RNA-Sequenz mit ihrem nativen Pendant um die MatK-Bindung könnte eine mögliche Autoregulation stören und eine MatK-Überexpression verursachen. Erste Western-Analysen der MatK-Expression sowie der Phänotyp dieser transplastomischen Pflanzen zeigten allerdings keine Auffälligkeiten im Vergleich zu Kontrollpflanzen. Weitergehende Analysen, z.B. der MatK-Expression während der Pflanzenentwicklung, werden zeigen, inwieweit diese ektopische Überexpression der putativen MatK-Autoregulationsbindestelle zu einer Deregulation der MatK-Translation führt.

Zusammenfassend geben die dargelegten Analysen keinen Hinweis darauf, dass für MatK ein ähnlicher Autoregulationsmechanismus zur Kontrolle der Translation beiträgt, wie er für die bakterielle Maturase LtrA beschrieben ist (Singh et al., 2002). Hinzu kommt die offensichtliche Funktionalität der N-terminal epitopmarkierten Maturase. Tatsächlich sollte die N-terminale HA-Epitopmarkierung die Stammschleife der putativen Regulationsbindestelle zerstören und damit einen (Spleiß-)Phänotyp erzeugen. Anomale Phänotypen waren jedoch weder im Erscheinungsbild der entsprechenden Pflanzen (s. Abb. 9, S. 46) noch in deren MatK-Expressionsmuster (s. Abb. 11, S.48) oder der Expression der MatK-Ziel-RNAs im Vergleich zu Kontrollpflanzen zu beobachten (s. Abb. 18, S. 65). Überdies zeigte auch die RIP-Chip-Analyse der MatK-

Kontakte mit seinem *trnK*-Heimatintrons keine Assoziation im Bereich des *matK*-Startcodons (s. Abb. 15, S. 53), wobei allerdings zu bedenken ist, dass für diese Untersuchungen das Stroma sieben Tage alter Keimlinge verwendet wurde. In dieser Altersstufe erreicht die MatK-Expression einen Maximalwert (s. Abb. 11, S.48). Damit könnte die Regulationsbindung theoretisch zugunsten einer hohen Translationsrate minimiert sein, z.B. durch Konkurrenz mit den anderen MatK-Ziel-RNAs. Inwieweit die Zusammensetzung des Pools MatK-gebundener RNAs sich während der Pflanzenentwicklung ändert, wird die Analyse MatK-coprizipitierter RNA aus transplastomischen Pflanzen verschiedenen Alters zeigen.

Es wurde vermutet, dass die autoregulative Bindung der LtrA-Maturase an DIVa wichtiger für die Intronmobilität als für den Spleißprozess ist (Cui et al., 2004). Aufgrund des Fehlens essentieller RT-Domänen kann *Retrohoming* für *matK* aber ausgeschlossen werden (Mohr et al., 1993). Dies könnte erklären, warum ein Verlust der MatK-Bindung in dieser Region möglich war.

Interessanterweise zeigte die Analyse der MatK-Kontakte mit dem *trnK*-Intron den zweithöchsten Wert der differentiellen Anreicherung in einer Region unmittelbar stromabwärts des *matK*-Leserahmens (Sonde *trnK* 39, s. Abb. 15, S. 53). 3'-UTRs sind Determinanten der Transkriptstabilität plastidärer mRNAs (Übersicht in Bollenbach et al., 2007). Dabei spielen stabile Stammschleifen in diesen Regionen eine entscheidende Rolle (Bollenbach et al., 2007). In der Tat findet sich in der Intronregion, die durch Sonde *trnK* 39 repräsentiert wird eine vorhergesagte Stammschleife (9 bp, davon 8 Watson-Crick-Paarungen, nicht gezeigt). Somit könnte die MatK-Bindung in diesem Bereich einen plastidenspezifischen Weg der Expressionsregulation durch Beeinflussung der Transkriptstabilität darstellen. Dies kann analog zu den bereits beschriebenen Versuchen *in planta* durch ektopische Überexpression dieser Region analysiert werden.

4.5 P67: Putative Funktionen eines PPR-SMR-Proteins

P67 gehört zur kleinen Familie der PPR-SMR-Proteine, die neben PPR-Domänen eine C-terminale SMR-Domäne aufweisen (*small MutS-related*, s. Abb. 21, S. 71). P67 wurde ursprünglich als Teil des nukleären rRNA-Prozessierungskomplexes vermutet, da es als Kern-rRNA-Vorläufer bindendes Protein aus Rettich-Zellextrakten isoliert worden ist (Echeverria und Lahmy, 1995). Immunolokalisations-Experimente sowie Fluores-

zenzprotein-Fusionen zeigten später jedoch die chloroplastidäre Lokalisation des Proteins (Lahmy et al., 2000; Lurin et al., 2004). Daneben ist eine *In-Vitro*-RNA-Bindaktivität von P67 beschrieben (Lahmy et al., 2000). P67 ist nahe verwandt mit GUN1, einem PPR-SMR-Protein, das eine zentrale Bedeutung für den retrograden Signalweg hat (Koussevitzky et al., 2007). Dieser bereits in den 80er Jahren identifizierte Signalweg koordiniert die wichtige intrazelluläre Kommunikation zwischen Chloroplasten und Zellkern und reguliert die Expression einer Vielzahl für die Chloroplastenbiogenese substantieller Komponenten (zusammengefasst z.B. in Kleine et al., 2009; Pogson et al., 2008; Woodson und Chory, 2008). Die Elemente der Signalkette sind noch nicht entdeckt, allerdings spielt GUN1 eine essentielle aber mechanistisch noch unbekannt Funktion für die Weiterleitung des Signals (Koussevitzky et al., 2007). Mit pTAC2 wurde ein anderes PPR-SMR-Protein bei der Analyse des plastidären Transkriptionskomplexes identifiziert (Pfalz et al., 2006). pTAC2 scheint eine essentielle Rolle in der plastidären Transkription wahrzunehmen (Pfalz et al., 2006). Für die genannten PPR-SMR-Proteine sind keine molekularen Funktionen bekannt. Somit kann eine funktionelle Charakterisierung von P67 dazu beitragen, die Aufgabe dieser kleinen Proteinfamilie in der plastidären Genexpression besser zu verstehen.

4.5.1 P67-Mutation: Phänotypische Divergenz in Mais/*Arabidopsis*

Um die P67-Funktion zu charakterisieren, wurden Insertionsmutanten der orthologen *P67*-Gene aus Mais und *Arabidopsis* isoliert (s. Abb. 22, S. 73, Abb. 23, S. 74). Für drei Mu-Insertionslinien in Mais konnte ein gegen *ZmP67* gerichteter Antikörper den Knockout der P67-Expression auf Proteinebene belegen (s. Abb. 24, S. 76). Komplementationstest-Kreuzungen zeigten die *cis*-Lokalisation der Insertionen (s. Abb. 22, S. 73, Abb. 24, S. 76). Der *P67*-Knockout in Mais verursacht einen schwach hellgrünen, z.T. gekörnt erscheinenden Phänotyp (s. Abb. 22, S. 73). Die Pflanzen sterben zwei bis drei Wochen nach der Keimung. In *Arabidopsis* wurden eine Transposon- und eine T-DNA-Insertionslinie identifiziert (s. Abb. 23, S. 74). Für beide Linien wurde der Verlust der *P67*-mRNA nachgewiesen. Die Insertionen im Leserahmen des *Arabidopsis-P67*-Gens verursachen keinen sichtbaren Phänotyp (s. Abb. 23, S. 74), die Pflanzen lassen sich problemlos propagieren. Lediglich unter Temperaturstress-Bedingungen (> 35 °C) kommt es zu einer marginalen Wachstumsverzögerung in den *Arabidopsis*-

P67-Insertionslinien im Vergleich zu wildtypischen Pflanzen (nicht gezeigt). Insgesamt verursacht demnach die *P67*-Mutation in Mais einen extremeren Phänotyp im Vergleich zu der in *Arabidopsis*. Bei der Untersuchung von Knockouts anderer orthologer PPR-Proteine in diesen beiden Organismen zeigte sich ein entgegengesetztes Bild. So führte z.B. der Knockout von PPR5 und PPR4 in *Arabidopsis* zur Embryoletalität, wohingegen Insertionen in den orthologen Maisgenen erst im Keimlingsstadium eine Letalität verursachten (Beick et al., 2008; Schmitz-Linneweber et al., 2006). In beiden Fällen bedingt der PPR-Knockout den Verlust essentieller Komponenten der plastidären Translationsmaschinerie (*trnG-UCC* bzw. *rps12*). Es wurde vermutet, dass die dadurch verursachte allgemeine Blockade der plastidären Translation zum Knockout essentieller Gene der Entwicklung führt, die in monokotyledonen Gräsern nicht auf dem Plastom kodiert sind (*ycf1/-2*, *accD*, Schmitz-Linneweber und Small, 2008). Dementgegen sind keine Beispiele bekannt, in denen die Mutation orthologer PPR-Proteine in Mais einen extremeren Phänotyp als in *Arabidopsis* hervorruft. Prinzipiell sind zwei Deutungen möglich. (i) Trotz der Homologie der *P67*-Sequenzen divergiert die Funktion zwischen Mais und *Arabidopsis*. (ii) Die meisten PPR-Proteine sind jedoch in Angiospermen hoch konserviert (O'Toole et al., 2008). Daneben ist für Mutanten der orthologen PPR54-Proteine aus *Arabidopsis* und Mais ein identischer Spleißphänotyp beobachtet worden (persönliche Mitteilung Michael Tillich). Somit ist es wahrscheinlicher, dass die *P67*-Funktion in beiden Organismen identisch/ähnlich und entsprechend die entwicklungsphysiologische Relevanz der beeinträchtigten Funktion in Mais größer als in *Arabidopsis* ist. Ein Hauptunterschied zwischen Mais und *Arabidopsis* liegt in der Art der primären CO₂-Fixierung über C₄- und C₃-Kohlenstoffintermediate (Überblick in Sitte et al., 1998). Der C₄-Metabolismus wird unter anderem durch den Chloroplastendimorphismus zwischen Bündelscheiden- und Mesophyllzellen ermöglicht (Überblick in Sitte et al., 1998). Dieser Dimorphismus drückt sich auch im Transkriptom und dem Proteom der Chloroplasten dieser Zelltypen aus (zusammengefasst in Majeran et al., 2008; Sheen, 1999). Die molekularen Ursachen dafür sind weitestgehend unverstanden. Aufgrund von Analysen der Transkriptionsaktivitäten wird jedoch vermutet, dass die differentielle Expression der entsprechenden plastidär kodierten Gene hauptsächlich durch posttranskriptionelle Regulation erreicht wird (Sheen, 1999). Somit könnte die *P67*-Funktion, z.B. durch posttranskriptionelle Regulation plastidärer Gene, mit den Anpassungen der

Chloroplastendifferenzierung von C₄-Pflanzen in Verbindung stehen, so dass ein Knockout der Proteinfunktion in Mais die beobachtete Keimlingsletalität verursacht, während der Knockout des *Arabidopsis*-Orthologen unter Standard-Anzuchtbedingungen keinen Phänotyp bedingt. Eine mögliche differentielle P67-Expression in Mesophyll- und Bündelscheidenzellen könnte z.B. durch Immunolokalisations-Experimente mit dem P67-Antikörper analysiert werden.

4.5.2 Einflüsse von P67 auf die Expression der plastidären ATPase

Aufgrund des chlorophylldefizienten Phänotyps der *P67*-Knockout-Pflanzen in Mais wurden repräsentativ Untereinheiten der Photosystemkomponenten durch Western-Analysen untersucht (s. Abb. 28, S. 81). Während die PsaD-, D1- und PetD-Untereinheiten der Photosysteme I/II und des Cytochrom-*b₆f*-Komplexes in den *P67*-Knockouts auf nahezu wildtypische Mengen akkumulieren, zeigte sich ein dramatischer Verlust in der AtpB-Untereinheit des ATPase-Komplexes auf wenige Prozent des wildtypischen Levels. Dieser Befund wurde mittlerweile durch Western-Analysen mit einem AtpF-spezifischen Antikörper bestätigt (nicht gezeigt, Antikörper von Prof. Dr. A. Barkan). Während bei den pleiotropen Effekten der Translationsinhibition, wie sie z.B. durch den Knockout von PPR4 und -5 verursacht werden, alle Komponenten des Photosystems gleichermaßen betroffen sind (Beick et al., 2008; Schmitz-Linneweber et al., 2006), bedingt der *ZmP67*-Knockout einen spezifischen Verlust der ATPase. Eine Western-Analyse von ATPase-Untereinheiten in den *Arabidopsis-P67*-Mutanten wird zeigen, inwieweit die entsprechende P67-Funktion, die die beobachtete ATPase-Reduktion in Mais verursacht, in *Arabidopsis* konserviert ist.

Die sechs plastidär kodierten ATPase-Untereinheiten sind in zwei Polycistrons lokalisiert und werden zusammen als *atpB/-E-* bzw. mit *rps2* als *rps2/atpI/-H/-F/-A-* Transkript kotranskribiert (Krebbbers et al., 1982; Miyagi et al., 1998; Stahl et al., 1993; Zurawski et al., 1982). Erstgenanntes Operon wird nicht prozessiert (Kapoor et al., 1994; Zurawski et al., 1982), im Falle des letztgenannten Operons findet eine posttranskriptionelle Prozessierung in kleinere Einheiten statt (Miyagi et al., 1998; Pfalz et al., 2009; Stahl et al., 1993). Es ist bekannt, dass die Expression der einzelnen (auch kern-kodierten) ATPase-Untereinheiten strikt koordiniert reguliert wird (Drapier et al., 2007). Somit könnte die beobachtete Reduktion der ATPase-Untereinheiten β (AtpB) und I

(AtpF) primärer Art sein oder auch sekundär durch den Ausfall der Expression einer oder mehrerer anderer Untereinheiten der ATPase bedingt sein. In der Tat zeigte eine erste *Microarray*-Analyse des plastidären Transkriptom einer *P67*-Mutante in Mais reduzierte *atpF*- und *atpA*-Transkriptlevels im Vergleich zu einer wildtypischen Kontrolle (Daten freundlicherweise durch Prof. Dr. A. Barkan zur Verfügung gestellt, nicht gezeigt). Demgegenüber waren die *atpI*- und *-H*- sowie die *atpB/-E*-Transkriptakkumulationen unverändert. Ausgehend von den bekannten Funktionen von PPR- und PPR-SMR-Proteinen bzw. deren Lokalisation in plastidären Proteinkomplexen sind verschiedene Funktionen von P67 bei der Expression der plastidären ATPase-Untereinheiten denkbar.

(i) Die Tatsache, dass mit pTAC2 ein PPR-SMR-Protein im plastidären Transkriptionskomplex identifiziert wurde sowie die DNA-Bindeeeigenschaften des PPR-SMR-Proteins GUN1 und seine Kolokalisation mit pTAC2 könnten eine P67-Funktion bei der Transkription des *atpB/-E*- und/oder des *rps2/atpI/-H/-F/-A*-Polycistrons vermuten lassen (Koussevitzky et al., 2007; Pfalz et al., 2006).

(ii) Daneben sind einige PPR-Proteine bekannt, deren Funktion in der Prozessierung von Transkripten oder dem Schutz dieser vor abbauenden Enzymen liegt (z.B. Beick et al., 2008; Meierhoff et al., 2003; Pfalz et al., 2009). Folglich könnte P67 derartige Funktionen an den *atp*-Transkripten ausüben. Mit PPR10 ist bereits ein PPR-Protein beschrieben, das an der Prozessierung bzw. dem Schutz des *rps2/atpI/-H/-F/-A*-Transkripts bzw. abgeleiteter, prozessierter Transkripte beteiligt ist (Pfalz et al., 2009).

(iii) Überdies findet sich im *atpF*-Vorläufertranskript ein Gruppe-II-Intron. Es sind verschiedene PPR-Proteine bekannt, die am Spleißprozess von Gruppe-II-Introns beteiligt sind (z.B. OTP51, de Longevialle et al., 2008; PPR4, Schmitz-Linneweber et al., 2006), so dass auch ein durch den *P67*-Knockout hervorgerufener Spleißdefekt die drastische Reduktion der ATPase-Akkumulation verursachen könnte.

(iv) Nicht zuletzt sind PPR-Proteine an der plastidären Translation beteiligt (PPR10, Pfalz et al., 2009; CRP1, Schmitz-Linneweber et al., 2005a). Entsprechend könnte auch P67 die Translation eines oder mehrerer der Transkripte der *atp*-Operons unterstützen. Dabei ist von Interesse, dass die *atpB*- und *atpE*-Leserahmen des entsprechenden Kotranskripts um einige Basen überlappen, in Mais aber dennoch gekoppelt translatiert werden (Gatenby et al., 1989). Dagegen liegen in Tabak und *Arabidopsis* auch eigene,

monocistronische *atpE*-Transkripte vor, die der Translation dienen können (Kapoor et al., 1994; Schweer et al., 2006). Wenn es sich bei P67 um einen Translationsfaktor der gekoppelten *atpB/-E*-Translation in Mais handeln würde, könnte dies eine Erklärung für den fehlenden Phänotyp der P67-Mutanten in *Arabidopsis* sein.

Northern-Analysen bzw. *Primer-Extensions* für die entsprechenden *atp*-Transkripte in Kombination mit der *Run-On*-Analyse der Transkriptionsaktivität und einer Analyse der Polysomenfraktion auf *atp*-Transkripte bzw. P67 können zeigen, inwieweit tatsächlich eine der vermuteten Funktionen von P67 ausgeführt wird.

Neben diesen möglichen P67-Funktionen ist aufgrund der nahen Verwandtschaft zu GUN1 auch eine Beteiligung am retrograden *Signalling* denkbar. Die Standardanalyse zum Nachweis eines *Genomes-Uncoupled*-Phänotyp zeigte jedoch in *Arabidopsis*-P67-Mutanten ein wildtypisches Regulationsverhalten (Repression der *LhcB*-Kerngenexpression nach Norflurazongabe, s. Abb. 27, S. 79), so dass eine Beteiligung an diesen Signalwegen unwahrscheinlich, aber nicht ausgeschlossen ist. Weitere Untersuchungen möglicherweise alternativer Signalwege sind nötig, um dieses Resultat abzusichern (z.B. Hemmung der plastidären Translation mit Lincomycin, Gray et al., 2003).

Zusammenfassend lassen die bisherigen Analysen eine Funktion von P67 bei der Expression von Untereinheiten der plastidären ATPase vermuten. Dennoch können pleiotrope Effekte des P67-Knockouts nicht ausgeschlossen werden. Durch weitere RIP-/DIP-Chip-Analysen könnten ein/mehrere *atp*-Transkript(e) als P67-Ziel(e) bestätigt oder möglicherweise weitere/andere Ziele identifiziert werden. Bisherige RIP-/DIP-Chip-Annäherungen zeigten keine P67-copräzipitierte RNA/DNA (s. Kap. 3.2.4, S. 78). Möglicherweise ist die P67-Nukleinsäurebindung schwach und wird durch den Prozess der Immunopräzipitation aufgelöst. Ein *Crosslinking* des Proteins mit der gebundenen Nukleinsäure könnte helfen, dieses Problem zu umgehen.

Literatur

- Allen, J. F. (2003): The function of genomes in bioenergetic organelles, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 358 [1429], Seite 19-38.
- Altschul, S. F.; Madden, T. L.; Schaffer, A. A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W. und Lipman, D. J. (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Res* 25 [17], Seite 3389-3402.
- Aronsson, H.; Schöttler, M. A.; Kelly, A. A.; Sundqvist, C.; Dormann, P.; Karim, S. und Jarvis, P. (2008): Monogalactosyldiacylglycerol deficiency in *Arabidopsis* affects pigment composition in the prolamellar body and impairs thylakoid membrane energization and photoprotection in leaves, *Plant Physiol* 148 [1], Seite 580-592.
- Aubourg, S.; Boudet, N.; Kreis, M. und Lecharny, A. (2000): In *Arabidopsis thaliana*, 1% of the genome codes for a novel protein family unique to plants, *Plant Mol Biol* 42 [4], Seite 603-613.
- Azevedo, J.; Courtois, F.; Hakimi, M. A.; Demarsy, E.; Lagrange, T.; Alcaraz, J. P.; Jaiswal, P.; Maréchal-Drouard, L. und Lerbs-Mache, S. (2008): Intraplastidial trafficking of a phage-type RNA polymerase is mediated by a thylakoid RING-H2 protein, *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 [26], Seite 9123-9128.
- Azevedo, J.; Courtois, F. und Lerbs-Mache, S. (2006): Sub-plastidial localization of two different phage-type RNA polymerases in spinach chloroplasts, *Nucleic Acids Res* 34 [2], Seite 436-444.
- Barbrook, A. C.; Howe, C. J. und Purton, S. (2006): Why are plastid genomes retained in non-photosynthetic organisms?, *Trends Plant Sci* 11 [2], Seite 101-108.
- 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 [4], Seite 437-445.
- Barkan, A. (1998): Approaches to investigating nuclear genes that function in chloroplast biogenesis in land plants, *Methods Enzymol* 297, Seite 38-57.
- Barkan, A.; Klipcan, L.; Ostersetzer, O.; Kawamura, T.; Asakura, Y. und Watkins, K. P. (2007): The CRM domain: an RNA binding module derived from an ancient ribosome-associated protein, *RNA* 13 [1], Seite 55-64.
- Barker, R. F.; Thompson, D. V.; Talbot, D. R.; Swanson, J. und Bennetzen, J. L. (1984): Nucleotide sequence of the maize transposable element *Mu1*, *Nucleic Acids Res* 12 [15], Seite 5955-5967.

- Barrick, D.; Villanueva, K.; Childs, J.; Kalil, R.; Schneider, T. D.; Lawrence, C. E.; Gold, L. und Stormo, G. D. (1994): Quantitative analysis of ribosome binding sites in *E. coli*, *Nucleic Acids Res* 22 [7], Seite 1287-1295.
- Barthet, M. M. und Hilu, K. W. (2007a): Evaluating evolutionary constraint on the rapidly evolving gene *matK* using protein composition, *J Mol Evol* 66 [2], Seite 85-97.
- Barthet, M. M. und Hilu, K. W. (2007b): Expression of *matK*: functional and evolutionary implications, *Am J Bot* 94 [8], Seite 1402-1412.
- Beick, S.; Schmitz-Linneweber, C.; Williams-Carrier, R.; Jensen, B. und Barkan, A. (2008): The pentatricopeptide repeat protein PPR5 stabilizes a specific tRNA precursor in maize chloroplasts, *Mol Cell Biol* 28 [17], Seite 5337-5347.
- Bendich, A. J. (2004): Circular chloroplast chromosomes: the grand illusion, *Plant Cell* 16 [7], Seite 1661-1666.
- Bertani, G. (1951): Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*, *J Bacteriol* 62 [3], Seite 293-300.
- Blocker, F. J.; Mohr, G.; Conlan, L. H.; Qi, L.; Belfort, M. und Lambowitz, A. M. (2005): Domain structure and three-dimensional model of a group II intron-encoded reverse transcriptase, *RNA* 11 [1], Seite 14-28.
- Bock, R. (2007): *Cell and Molecular Biology of Plastids*, 19/2007, Bock, R., Springer Verlag, Berlin, ISBN: 3540753761.
- Bock, R.; Kossel, H. und Maliga, P. (1994): Introduction of a heterologous editing site into the tobacco plastid genome: the lack of RNA editing leads to a mutant phenotype, *EMBO J* 13 [19], Seite 4623-4628.
- Bollenbach, T. J.; Schuster, G.; Portnoy, V. und Stern, D. B. (2007): Processing, degradation, and polyadenylation of chloroplast transcripts, Bock, R., *Cell and Molecular Biology of Plastids*, 19/2007, Seite 175-211, Springer Verlag, Berlin.
- Cech, T. R. (1986): The generality of self-splicing RNA: relationship to nuclear mRNA splicing, *Cell* 44 [2], Seite 207-210.
- Choquet, Y.; Stern, D. B.; Wostrikoff, K.; Kuras, R.; Girard-Bascou, J. und Wollman, F. A. (1998): Translation of cytochrome *f* is autoregulated through the 5' untranslated region of *petA* mRNA in *Chlamydomonas* chloroplasts, *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 [8], Seite 4380-4385.
- Choquet, Y. und Wollman, F. A. (2002): Translational regulations as specific traits of chloroplast gene expression, *FEBS Lett* 529 [1], Seite 39-42.

- Corpet, F. (1988): Multiple sequence alignment with hierarchical clustering, *Nucleic Acids Res* 16 [22], Seite 10881-10890.
- Cousineau, B.; Smith, D.; Lawrence-Cavanagh, S.; Mueller, J. E.; Yang, J.; Mills, D.; Manias, D.; Dunny, G.; Lambowitz, A. M. und Belfort, M. (1998): Retrohoming of a bacterial group II intron: mobility via complete reverse splicing, independent of homologous DNA recombination, *Cell* 94 [4], Seite 451-462.
- Cui, X.; Matsuura, M.; Wang, Q.; Ma, H. und Lambowitz, A. M. (2004): A group II intron-encoded maturase functions preferentially *in cis* and requires both the reverse transcriptase and X domains to promote RNA splicing, *J Mol Biol* 340 [2], Seite 211-231.
- Dai, L.; Chai, D.; Gu, S. Q.; Gabel, J.; Noskov, S. Y.; Blocker, F. J.; Lambowitz, A. M. und Zimmerly, S. (2008): A three-dimensional model of a group II intron RNA and its interaction with the intron-encoded reverse transcriptase, *Mol Cell* 30 [4], Seite 472-485.
- Daniell, H. und Chase, C. (2004): *Molecular biology and biotechnology of plant organelles: chloroplasts and mitochondria*, Springer, Dordrecht, the Netherlands; Norwell, MA, ISBN: 1402027133 (HB).
- de Longevialle, A. F.; Hendrickson, L.; Taylor, N. L.; Delannoy, E.; Lurin, C.; Badger, M.; Millar, A. H. und Small, I. (2008): The pentatricopeptide repeat gene *OTP51* with two LAGLIDADG motifs is required for the *cis*-splicing of plastid *ycf3* intron 2 in *Arabidopsis thaliana*, *Plant J* 56 [1], Seite 157-168.
- del Campo, E. M. (2009): Post-transcriptional control of chloroplast gene expression, *Gene Regul Syst Bio* 3, Seite 31-47.
- del Campo, E. M. und Casano, L. M. (2008): Degradation of plastid unspliced transcripts and lariat group II introns, *Biochimie* 90 [3], Seite 474-483.
- Delannoy, E.; Le Ret, M.; Faivre-Nitschke, E.; Estavillo, G. M.; Bergdoll, M.; Taylor, N. L.; Pogson, B. J.; Small, I.; Imbault, P. und Gualberto, J. M. (2009): *Arabidopsis* tRNA adenosine deaminase arginine edits the wobble nucleotide of chloroplast tRNA^{Arg}(ACG) and is essential for efficient chloroplast translation, *Plant Cell* 21 [7], Seite 2058-2071.
- Delannoy, E.; Stanley, W. A.; Bond, C. S. und Small, I. D. (2007): Pentatricopeptide repeat (PPR) proteins as sequence-specificity factors in post-transcriptional processes in organelles, *Biochem Soc Trans* 35 [Pt 6], Seite 1643-1647.
- Demarsy, E.; Courtois, F.; Azevedo, J.; Buhot, L. und Lerbs-Mache, S. (2006): Building up of the plastid transcriptional machinery during germination and early plant development, *Plant Physiol* 142 [3], Seite 993-1003.

- Deno, H.; Kato, A.; Shinozaki, K. und Sugiura, M. (1982): Nucleotide sequences of tobacco chloroplast genes for elongator tRNA^{Met} and tRNA^{Val} (UAC): the tRNA^{Val} (UAC) gene contains a long intron, *Nucleic Acids Res* 10 [23], Seite 7511-7520.
- Deshpande, N. N.; Bao, Y. und Herrin, D. L. (1997): Evidence for light/redox-regulated splicing of *psbA* pre-RNAs in *Chlamydomonas* chloroplasts, *RNA* 3 [1], Seite 37-48.
- Diercks, T.; AB, E.; Daniels, M. A.; de Jong, R. N.; Besseling, R.; Kaptein, R. und Folkers, G. E. (2008): Solution structure and characterization of the DNA-binding activity of the B3BP-Smr domain, *J Mol Biol* 383 [5], Seite 1156-1170.
- Drapier, D.; Rimbault, B.; Vallon, O.; Wollman, F. A. und Choquet, Y. (2007): Intertwined translational regulations set uneven stoichiometry of chloroplast ATP synthase subunits, *EMBO J* 26 [15], Seite 3581-3591.
- Drescher, A. (2003): *ycf1*, *ycf14* und RNA-Edierung: Untersuchungen an im Lauf der Plastidenevolution neu hinzu gewonnenen Genen und Eigenschaften, Dissertation, Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München.
- du Jardin, P.; Portetelle, D.; Harvengt, L.; Dumont, M. und Wathelet, B. (1994): Expression of intron-encoded maturase-like polypeptides in potato chloroplasts, *Curr Genet* 25 [2], Seite 158-163.
- Dühring, U.; Axmann, I. M.; Hess, W. R. und Wilde, A. (2006): An internal antisense RNA regulates expression of the photosynthesis gene *isiA*, *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 [18], Seite 7054-7058.
- Dürrenberger, F. und Rochaix, J. D. (1991): Chloroplast ribosomal intron of *Chlamydomonas reinhardtii*: *in vitro* self-splicing, DNA endonuclease activity and *in vivo* mobility, *EMBO J* 10 [11], Seite 3495-3501.
- Echeverria, M. und Lahmy, S. (1995): Identification of a 67 kDa protein that binds specifically to the pre-rRNA primary processing site in a higher plant, *Nucleic Acids Res* 23 [24], Seite 4963-4970.
- Eickbush, T. H. (1997): Telomerase and retrotransposons: which came first?, *Science* 277 [5328], Seite 911-912.
- Ems, S. C.; Morden, C. W.; Dixon, C. K.; Wolfe, K. H.; dePamphilis, C. W. und Palmer, J. D. (1995): Transcription, splicing and editing of plastid RNAs in the nonphotosynthetic plant *Epifagus virginiana*, *Plant Mol Biol* 29 [4], Seite 721-733.
- Fedorova, O. und Zingler, N. (2007): Group II introns: structure, folding and splicing mechanism, *Biol Chem* 388 [7], Seite 665-678.

- Ferrando, A.; Farras, R.; Jasik, J.; Schell, J. und Koncz, C. (2000): Intron-tagged epitope: a tool for facile detection and purification of proteins expressed in *Agrobacterium*-transformed plant cells, *Plant J* 22 [6], Seite 553-560.
- Fukui, K.; Kosaka, H.; Kuramitsu, S. und Masui, R. (2007): Nuclease activity of the MutS homologue MutS2 from *Thermus thermophilus* is confined to the Smr domain, *Nucleic Acids Res* 35 [3], Seite 850-860.
- Funk, H. T.; Berg, S.; Krupinska, K.; Maier, U. G. und Krause, K. (2007): Complete DNA sequences of the plastid genomes of two parasitic flowering plant species, *Cuscuta reflexa* and *Cuscuta gronovii*, *BMC Plant Biol* 7, Seite 45-56.
- Gatenby, A. A.; Rothstein, S. J. und Nomura, M. (1989): Translational coupling of the maize chloroplast *atpB* and *atpE* genes, *Proc Natl Acad Sci U S A* 86 [11], Seite 4066-4070.
- Glanz, S. und Kück, U. (2009): Trans-splicing of organelle introns--a detour to continuous RNAs, *Bioessays* 31 [9], Seite 921-934.
- Grabowski, P. J.; Padgett, R. A. und Sharp, P. A. (1984): Messenger RNA splicing *in vitro*: an excised intervening sequence and a potential intermediate, *Cell* 37 [2], Seite 415-427.
- Gray, J. C.; Sullivan, J. A.; Wang, J. H.; Jerome, C. A. und MacLean, D. (2003): Coordination of plastid and nuclear gene expression, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 358 [1429], Seite 135-145.
- Gray, M. W. (1999): Evolution of organellar genomes, *Curr Opin Genet Dev* 9 [6], Seite 678-687.
- Guo, H.; Karberg, M.; Long, M.; Jones, J. P., 3rd; Sullenger, B. und Lambowitz, A. M. (2000): Group II introns designed to insert into therapeutically relevant DNA target sites in human cells, *Science* 289 [5478], Seite 452-457.
- Hammani, K.; Okuda, K.; Tanz, S. K.; Chateigner-Boutin, A. L.; Shikanai, T. und Small, I. (2009): A Study of New *Arabidopsis* Chloroplast RNA Editing Mutants Reveals General Features of Editing Factors and Their Target Sites, *Plant Cell* 21 [11], Seite 3686-3699.
- Hanahan, D. (1983): Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids, *J Mol Biol* 166 [4], Seite 557-580.
- Hao, D. C.; Chen, S. L. und Xiao, P. G. (2009): Molecular evolution and positive Darwinian selection of the chloroplast maturase *matK*, *J Plant Res*.
- Hausner, G.; Olson, R.; Simon, D.; Johnson, I.; Sanders, E. R.; Karol, K. G.; McCourt, R. M. und Zimmerly, S. (2006): Origin and evolution of the chloroplast *trnK*

- (*matK*) intron: a model for evolution of group II intron RNA structures, *Mol Biol Evol* 23 [2], Seite 380-391.
- Hegeman, C. E.; Halter, C. P.; Owens, T. G. und Hanson, M. R. (2005): Expression of complementary RNA from chloroplast transgenes affects editing efficiency of transgene and endogenous chloroplast transcripts, *Nucleic Acids Res* 33 [5], Seite 1454-1464.
- Herrmann, R. G.; Bohnert, H. J.; Kowallik, K. V. und Schmitt, J. M. (1975): Size, conformation and purity of chloroplast DNA of some higher plants, *Biochim Biophys Acta* 378 [2], Seite 305-317.
- Hirao, T.; Watanabe, A.; Kurita, M.; Kondo, T. und Takata, K. (2009): A frameshift mutation of the chloroplast *matK* coding region is associated with chlorophyll deficiency in the *Cryptomeria japonica* virescent mutant *Wogon-Sugi*, *Curr Genet* 55 [3], Seite 311-321.
- Huang, H. R.; Chao, M. Y.; Armstrong, B.; Wang, Y.; Lambowitz, A. M. und Perlman, P. S. (2003): The DIVa maturase binding site in the yeast group II intron *ai2* is essential for intron homing but not for *in vivo* splicing, *Mol Cell Biol* 23 [23], Seite 8809-8819.
- Iyer, R. R.; Pluciennik, A.; Burdett, V. und Modrich, P. L. (2006): DNA mismatch repair: functions and mechanisms, *Chem Rev* 106 [2], Seite 302-323.
- Jarrell, K. A.; Peebles, C. L.; Dietrich, R. C.; Romiti, S. L. und Perlman, P. S. (1988): Group II intron self-splicing. Alternative reaction conditions yield novel products, *J Biol Chem* 263 [7], Seite 3432-3439.
- Jenkins, B. D.; Kulhanek, D. J. und Barkan, A. (1997): Nuclear mutations that block group II RNA splicing in maize chloroplasts reveal several intron classes with distinct requirements for splicing factors, *Plant Cell* 9 [3], Seite 283-296.
- Kang, J.; Huang, S. und Blaser, M. J. (2005): Structural and functional divergence of MutS2 from bacterial MutS1 and eukaryotic MSH4-MSH5 homologs, *J Bacteriol* 187 [10], Seite 3528-3537.
- Kapoor, S.; Wakasugi, T.; Deno, H. und Sugiura, M. (1994): An *atpE*-specific promoter within the coding region of the *atpB* gene in tobacco chloroplast DNA, *Curr Genet* 26 [3], Seite 263-268.
- Karcher, D. und Bock, R. (2009): Identification of the chloroplast adenosine-to-inosine tRNA editing enzyme, *RNA* 15 [7], Seite 1251-1257.
- Karpenahalli, M. R.; Lupas, A. N. und Soding, J. (2007): TPRpred: a tool for prediction of TPR-, PPR- and SEL1-like repeats from protein sequences, *BMC Bioinformatics* 8, Seite 2.

- Kavanagh, T. A.; Thanh, N. D.; Lao, N. T.; McGrath, N.; Peter, S. O.; Horvath, E. M.; Dix, P. J. und Medgyesy, P. (1999): Homeologous plastid DNA transformation in tobacco is mediated by multiple recombination events, *Genetics* 152 [3], Seite 1111-1122.
- Keren, I.; Bezawork-Geleta, A.; Kolton, M.; Maayan, I.; Belausov, E.; Levy, M.; Mett, A.; Gidoni, D.; Shaya, F. und Ostersetzer-Biran, O. (2009): AtnMat2, a nuclear-encoded maturase required for splicing of group-II introns in *Arabidopsis* mitochondria, *RNA* 15 [12], Seite 2299-2311.
- Keren, I.; Klipcan, L.; Bezawork-Geleta, A.; Kolton, M.; Shaya, F. und Ostersetzer-Biran, O. (2008): Characterization of the molecular basis of group II intron RNA recognition by CRS1-CRM domains, *J Biol Chem* 283 [34], Seite 23333-23342.
- Kim, J. K. und Hollingsworth, M. J. (1993): Splicing of group II introns in spinach chloroplasts (*in vivo*): analysis of lariat formation, *Curr Genet* 23 [2], Seite 175-180.
- Kittle, J. D., Jr.; Mohr, G.; Gianelos, J. A.; Wang, H. und Lambowitz, A. M. (1991): The *Neurospora* mitochondrial tyrosyl-tRNA synthetase is sufficient for group I intron splicing *in vitro* and uses the carboxy-terminal tRNA-binding domain along with other regions, *Genes Dev* 5 [6], Seite 1009-1021.
- Klaff, P. (1995): mRNA decay in spinach chloroplasts: *psbA* mRNA degradation is initiated by endonucleolytic cleavages within the coding region, *Nucleic Acids Res* 23 [23], Seite 4885-4892.
- Kleine, T.; Voigt, C. und Leister, D. (2009): Plastid signalling to the nucleus: messengers still lost in the mists?, *Trends Genet* 25 [4], Seite 185-192.
- Koop, H. U.; Steinmuller, K.; Wagner, H.; Rossler, C.; Eibl, C. und Sacher, L. (1996): Integration of foreign sequences into the tobacco plastome via polyethylene glycol-mediated protoplast transformation, *Planta* 199 [2], Seite 193-201.
- Kössel, H.; Edwards, K.; Koch, W.; Langridge, P.; Schiefermayr, E.; Schwarz, Z.; Strittmatter, G. und Zenke, G. (1982): Structural and functional analysis of an rRNA operon and its flanking tRNA genes from *Zea mays* chloroplasts, *Nucleic Acids Symp Ser* [11], Seite 117-120.
- Koussevitzky, S.; Nott, A.; Mockler, T. C.; Hong, F.; Sachetto-Martins, G.; Surpin, M.; Lim, J.; Mittler, R. und Chory, J. (2007): Signals from chloroplasts converge to regulate nuclear gene expression, *Science* 316 [5825], Seite 715-719.
- Krause, K. (2008): From chloroplasts to "cryptic" plastids: evolution of plastid genomes in parasitic plants, *Curr Genet* 54 [3], Seite 111-121.

- Krebbers, E. T.; Larrinua, I. M.; McIntosh, L. und Bogorad, L. (1982): The maize chloroplast genes for the β and ϵ subunits of the photosynthetic coupling factor CF₁ are fused, *Nucleic Acids Res* 10 [16], Seite 4985-5002.
- Kroeger, T. S.; Watkins, K. P.; Friso, G.; van Wijk, K. J. und Barkan, A. (2009): A plant-specific RNA-binding domain revealed through analysis of chloroplast group II intron splicing, *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 [11], Seite 4537-4542.
- Kunst, L. (1998): Preparation of physiologically active chloroplasts from *Arabidopsis*, *Methods Mol Biol* 82, Seite 43-48.
- Kutschera, U. und Niklas, K. J. (2004): The modern theory of biological evolution: an expanded synthesis, *Naturwissenschaften* 91 [6], Seite 255-276.
- Labouesse, M.; Netter, P. und Schroeder, R. (1984): Molecular basis of the 'box effect', A maturase deficiency leading to the absence of splicing of two introns located in two split genes of yeast mitochondrial DNA, *Eur J Biochem* 144 [1], Seite 85-93.
- Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 [5259], Seite 680-685.
- Lahmy, S.; Barneche, F.; Derancourt, J.; Filipowicz, W.; Delseny, M. und Echeverria, M. (2000): A chloroplastic RNA-binding protein is a new member of the PPR family, *FEBS Lett* 480, Seite 255-260.
- Lambowitz, A. M. und Belfort, M. (1993): Introns as mobile genetic elements, *Annu Rev Biochem* 62, Seite 587-622.
- Lambowitz, A. M.; Caprara, M. G.; Zimmerly, S. und Perlman, P. S. (1999): Group I and group II ribozymes as RNPs: clues to the past and guides to the future, Gesteland, R. F.; Cech, T. R. und Atkins, J. F., *The RNA world : the nature of modern RNA suggests a prebiotic RNA*, Seite 451-485, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Lambowitz, A. M. und Zimmerly, S. (2004): Mobile group II introns, *Annu Rev Genet* 38, Seite 1-35.
- Lange, H.; Sement, F. M.; Canaday, J. und Gagliardi, D. (2009): Polyadenylation-assisted RNA degradation processes in plants, *Trends Plant Sci* 14 [9], Seite 497-504.
- Legen, J.; Wanner, G.; Herrmann, R. G.; Small, I. und Schmitz-Linneweber, C. (2007): Plastid tRNA genes *trnC*-GCA and *trnN*-GUU are essential for plant cell development, *Plant J* 51 [5], Seite 751-762.
- Li-Pook-Than, J. und Bonen, L. (2006): Multiple physical forms of excised group II intron RNAs in wheat mitochondria, *Nucleic Acids Res* 34 [9], Seite 2782-2790.

- Liere, K. und Börner, T. (2007): Transcription and transcriptional regulation in plastids, Bock, R., Cell and Molecular Biology of Plastids, 19/2007, Seite 121-174, Springer Verlag, Berlin.
- Liere, K. und Link, G. (1995): RNA-binding activity of the *matK* protein encoded by the chloroplast *trnK* intron from mustard (*Sinapis alba* L.), Nucleic Acids Res 23 [6], Seite 917-921.
- Loiselay, C.; Gumpel, N. J.; Girard-Bascou, J.; Watson, A. T.; Purton, S.; Wollman, F. A. und Choquet, Y. (2008): Molecular identification and function of *cis*- and *trans*-acting determinants for *petA* transcript stability in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts, Mol Cell Biol 28 [17], Seite 5529-5542.
- Lung, B.; Zemann, A.; Madej, M. J.; Schuelke, M.; Techritz, S.; Ruf, S.; Bock, R. und Hüttenhofer, A. (2006): Identification of small non-coding RNAs from mitochondria and chloroplasts, Nucleic Acids Res 34 [14], Seite 3842-3852.
- Lurin, C.; Andres, C.; Aubourg, S.; Bellaoui, M.; Bitton, F.; Bruyere, C.; Caboche, M.; Debast, C.; Gualberto, J.; Hoffmann, B.; Lechamy, A.; Le Ret, M.; Martin-Magniette, M. L.; Mireau, H.; Peeters, N.; Renou, J. P.; Szurek, B.; Taconnat, L. und Small, I. (2004): Genome-wide analysis of *Arabidopsis* pentatricopeptide repeat proteins reveals their essential role in organelle biogenesis, Plant Cell 16 [8], Seite 2089-2103.
- Maier, U. G.; Bozarth, A.; Funk, H. T.; Zauner, S.; Rensing, S. A.; Schmitz-Linneweber, C.; Börner, T. und Tillich, M. (2008): Complex chloroplast RNA metabolism: just debugging the genetic programme?, BMC Biol 6, Seite 36.
- Majeran, W.; Zybaylov, B.; Ytterberg, A. J.; Dunsmore, J.; Sun, Q. und van Wijk, K. J. (2008): Consequences of C₄ differentiation for chloroplast membrane proteomes in maize mesophyll and bundle sheath cells, Mol Cell Proteomics 7 [9], Seite 1609-1638.
- Malik, H. S. und Henikoff, S. (2000): Dual recognition-incision enzymes might be involved in mismatch repair and meiosis, Trends Biochem Sci 25 [9], Seite 414-418.
- Margulies, M. M.; Tiffany, H. L. und Hattori, T. (1987): Photosystem I reaction center polypeptides of spinach are synthesized on thylakoid-bound ribosomes, Arch Biochem Biophys 254 [2], Seite 454-461.
- Margulis, L. (1970): Origin of eukaryotic cells : evidence and research implications for a theory of the origin and evolution of microbial, plant, and animal cells on the Precambrian earth, Yale University Press, New Haven, London, ISBN: 0300013531.
- Marín-Navarro, J.; Manuell, A. L.; Wu, J. und S, P. Mayfield (2007): Chloroplast translation regulation, Photosynth Res 94 [2-3], Seite 359-374.

- Martin, W.; Hoffmeister, M.; Rotte, C. und Henze, K. (2001): An overview of endosymbiotic models for the origins of eukaryotes, their ATP-producing organelles (mitochondria and hydrogenosomes), and their heterotrophic lifestyle, *Biol Chem* 382 [11], Seite 1521-1539.
- Martin, W. und Koonin, E. V. (2006): Introns and the origin of nucleus-cytosol compartmentalization, *Nature* 440 [7080], Seite 41-45.
- Martin, W.; Rujan, T.; Richly, E.; Hansen, A.; Cornelsen, S.; Lins, T.; Leister, D.; Stoebe, B.; Hasegawa, M. und Penny, D. (2002): Evolutionary analysis of *Arabidopsis*, cyanobacterial, and chloroplast genomes reveals plastid phylogeny and thousands of cyanobacterial genes in the nucleus, *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 [19], Seite 12246-12251.
- Mathews, D. H.; Sabina, J.; Zuker, M. und Turner, D. H. (1999): Expanded sequence dependence of thermodynamic parameters improves prediction of RNA secondary structure, *J Mol Biol* 288 [5], Seite 911-940.
- Matsuura, M.; Noah, J. W. und Lambowitz, A. M. (2001): Mechanism of maturase-promoted group II intron splicing, *EMBO J* 20 [24], Seite 7259-7270.
- McNeal, J. R.; Kuehl, J. V.; Boore, J. L.; Leebens-Mack, J. und dePamphilis, C. W. (2009): Parallel loss of plastid introns and their maturase in the genus *Cuscuta*, *PLoS One* 4 [6], Seite e5982.
- Meierhoff, K.; Felder, S.; Nakamura, T.; Bechtold, N. und Schuster, G. (2003): HCF152, an *Arabidopsis* RNA binding pentatricopeptide repeat protein involved in the processing of chloroplast *psbB-psbT-psbH-petB-petD* RNAs, *Plant Cell* 15 [6], Seite 1480-1495.
- Meng, B. Y.; Wakasugi, T. und Sugiura, M. (1991): Two promoters within the *psbK-psbI-trnG* gene cluster in tobacco chloroplast DNA, *Curr Genet* 20 [3], Seite 259-264.
- Michel, F. und Ferat, J. L. (1995): Structure and activities of group II introns, *Annu Rev Biochem* 64, Seite 435-461.
- Michel, F.; Umesono, K. und Ozeki, H. (1989): Comparative and functional anatomy of group II catalytic introns--a review, *Gene* 82 [1], Seite 5-30.
- Miller, J. H. (1972): *Experiments in molecular genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory, [Cold Spring Harbor, N.Y.], ISBN: 0879691069.
- Miyagi, T.; Kapoor, S.; Sugita, M. und Sugiura, M. (1998): Transcript analysis of the tobacco plastid operon *rps2/atpI/H/F/A* reveals the existence of a non-consensus type II (NCII) promoter upstream of the *atpI* coding sequence, *Mol Gen Genet* 257 [3], Seite 299-307.

- Mohr, G. und Lambowitz, A. M. (2003): Putative proteins related to group II intron reverse transcriptase/maturases are encoded by nuclear genes in higher plants, *Nucleic Acids Res* 31 [2], Seite 647-652.
- Mohr, G.; Perlman, P. S. und 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, *Nucleic Acids Res* 21 [22], Seite 4991-4997.
- Moreira, D. und Philippe, H. (1999): Smr: a bacterial and eukaryotic homologue of the C-terminal region of the MutS2 family, *Trends Biochem Sci* 24 [8], Seite 298-300.
- Murashige, T. und Skoog, F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture, *Physiol Plant* 15, Seite 473-497.
- Murray, M. G. und Thompson, W. F. (1980): Rapid isolation of high molecular weight plant DNA, *Nucleic Acids Res* 8 [19], Seite 4321-4325.
- Nakagawa, N. und Sakurai, N. (2006): A mutation in At-nMat1a, which encodes a nuclear gene having high similarity to group II intron maturase, causes impaired splicing of mitochondrial NAD4 transcript and altered carbon metabolism in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Cell Physiol* 47 [6], Seite 772-783.
- Nakamura, T.; Furuhashi, Y.; Hasegawa, K.; Hashimoto, H.; Watanabe, K.; Obokata, J.; Sugita, M. und Sugiura, M. (2003): Array-based analysis on tobacco plastid transcripts: preparation of a genomic microarray containing all genes and all intergenic regions, *Plant Cell Physiol* 44 [8], Seite 861-867.
- Nakamura, T.; Ohta, M.; Sugiura, M. und Sugita, M. (2001): Chloroplast ribonucleoproteins function as a stabilizing factor of ribosome-free mRNAs in the stroma, *J Biol Chem* 276 [1], Seite 147-152.
- Nakamura, T. und Sugita, M. (2008): A conserved DYW domain of the pentatricopeptide repeat protein possesses a novel endoribonuclease activity, *FEBS Lett* 582 [30], Seite 4163-4168.
- Neuhaus, H. und Link, G. (1987): The chloroplast tRNA^{Lys}(UUU) gene from mustard (*Sinapis alba*) contains a class II intron potentially coding for a maturase-related polypeptide, *Curr Genet* 11 [4], Seite 251-257.
- O'Toole, N.; Hattori, M.; Andres, C.; Lida, K.; Lurin, C.; Schmitz-Linneweber, C.; Sugita, M. und Small, I. (2008): On the expansion of the pentatricopeptide repeat gene family in plants, *Mol Biol Evol* 25 [6], Seite 1120-1128.
- Ostersetzer, O.; Cooke, A. M.; Watkins, K. P. und Barkan, A. (2005): CRS1, a chloroplast group II intron splicing factor, promotes intron folding through specific interactions with two intron domains, *Plant Cell* 17 [1], Seite 241-255.

- Pertl, H.; Schulze, W. X. und Obermeyer, G. (2009): The pollen organelle membrane proteome reveals highly spatial-temporal dynamics during germination and tube growth of lily pollen, *J Proteome Res* 8 [11], Seite 5142-5152.
- Pfalz, J.; Bayraktar, O. A.; Prikryl, J. und Barkan, A. (2009): Site-specific binding of a PPR protein defines and stabilizes 5' and 3' mRNA termini in chloroplasts, *EMBO J* 28 [14], Seite 2042-2052.
- Pfalz, J.; Liere, K.; Kandlbinder, A.; Dietz, K. J. und Oelmüller, R. (2006): pTAC2, -6, and -12 are components of the transcriptionally active plastid chromosome that are required for plastid gene expression, *Plant Cell* 18 [1], Seite 176-197.
- Pinto, A. V.; Mathieu, A.; Marsin, S.; Veaute, X.; Ielpi, L.; Labigne, A. und Radicella, J. P. (2005): Suppression of homologous and homeologous recombination by the bacterial MutS2 protein, *Mol Cell* 17 [1], Seite 113-120.
- Podar, M.; Chu, V. T.; Pyle, A. M. und Perlman, P. S. (1998): Group II intron splicing *in vivo* by first-step hydrolysis, *Nature* 391 [6670], Seite 915-918.
- Pogson, B. J.; Woo, N. S.; Forster, B. und Small, I. D. (2008): Plastid signalling to the nucleus and beyond, *Trends Plant Sci* 13 [11], Seite 602-609.
- Porra, R.J.; Thompson, W.A. und Kriedemann, P.E. (1989): Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls *a* and *b* extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy, *Biochim Biophys Acta* 975, Seite 384–394.
- Prikryl, J.; Watkins, K. P.; Friso, G.; van Wijk, K. J. und Barkan, A. (2008): A member of the Whirly family is a multifunctional RNA- and DNA-binding protein that is essential for chloroplast biogenesis, *Nucleic Acids Res* 36 [16], Seite 5152-5165.
- Qin, P. Z. und Pyle, A. M. (1998): The architectural organization and mechanistic function of group II intron structural elements, *Curr Opin Struct Biol* 8 [3], Seite 301-308.
- Rambo, R. P. und Doudna, J. A. (2004): Assembly of an active group II intron-maturase complex by protein dimerization, *Biochemistry* 43 [21], Seite 6486-6497.
- Raynaud, C.; Loiselay, C.; Wostrikoff, K.; Kuras, R.; Girard-Bascou, J.; Wollman, F. A. und Choquet, Y. (2007): Evidence for regulatory function of nucleus-encoded factors on mRNA stabilization and translation in the chloroplast, *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 [21], Seite 9093-9098.
- Rogalski, M.; Karcher, D. und Bock, R. (2008): Superwobbling facilitates translation with reduced tRNA sets, *Nat Struct Mol Biol* 15 [2], Seite 192-198.

- Rogalski, M.; Ruf, S. und Bock, R. (2006): Tobacco plastid ribosomal protein S18 is essential for cell survival, *Nucleic Acids Res* 34 [16], Seite 4537-4545.
- Ruskin, B.; Krainer, A. R.; Maniatis, T. und Green, M. R. (1984): Excision of an intact intron as a novel lariat structure during pre-mRNA splicing *in vitro*, *Cell* 38 [1], Seite 317-331.
- Saha, D.; Prasad, A. M. und Srinivasan, R. (2007): Pentatricopeptide repeat proteins and their emerging roles in plants, *Plant Physiol Biochem* 45 [8], Seite 521-534.
- Saldanha, R.; Chen, B.; Wank, H.; Matsuura, M.; Edwards, J. und Lambowitz, A. M. (1999): RNA and protein catalysis in group II intron splicing and mobility reactions using purified components, *Biochemistry* 38 [28], Seite 9069-9083.
- Sambrook, J. und Russell, D. W. (2001): *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., ISBN: 0879695773 (paper), 0879695765 (cloth).
- San Filippo, J. und Lambowitz, A. M. (2002): Characterization of the C-terminal DNA-binding/DNA endonuclease region of a group II intron-encoded protein, *J Mol Biol* 324 [5], Seite 933-951.
- Schmitz-Linneweber, C. und Barkan, A. (2007): RNA splicing and RNA editing in chloroplasts, Bock, R., *Cell and Molecular Biology of Plastids*, 19/2007, Seite 213-248, Springer Verlag, Berlin.
- Schmitz-Linneweber, C.; Kushnir, S.; Babiychuk, E.; Poltnigg, P.; Herrmann, R. G. und Maier, R. M. (2005b): Pigment deficiency in nightshade/tobacco cybrids is caused by the failure to edit the plastid ATPase alpha-subunit mRNA, *Plant Cell* 17 [6], Seite 1815-1828.
- Schmitz-Linneweber, C. und Small, I. (2008): Pentatricopeptide repeat proteins: a socket set for organelle gene expression, *Trends Plant Sci* 13 [12], Seite 663-670.
- Schmitz-Linneweber, C.; Tillich, M.; Herrmann, R. G. und Maier, R. M. (2001): Heterologous, splicing-dependent RNA editing in chloroplasts: allotetraploidy provides trans-factors, *EMBO J* 20 [17], Seite 4874-4883.
- Schmitz-Linneweber, C.; Williams-Carrier, R. und Barkan, A. (2005a): RNA immunoprecipitation and microarray analysis show a chloroplast Pentatricopeptide repeat protein to be associated with the 5' region of mRNAs whose translation it activates, *Plant Cell* 17 [10], Seite 2791-2804.
- Schmitz-Linneweber, C.; Williams-Carrier, R. E.; Williams-Voelker, P. M.; Kroeger, T. S.; Vichas, A. und Barkan, A. (2006): A pentatricopeptide repeat protein facilitates the *trans*-splicing of the maize chloroplast *rps12* pre-mRNA, *Plant Cell* 18 [10], Seite 2650-2663.

- Schöttler, M. A.; Flügel, C.; Thiele, W.; Stegemann, S. und Bock, R. (2007): The plastome-encoded PsaJ subunit is required for efficient Photosystem I excitation, but not for plastocyanin oxidation in tobacco, *Biochem J* 403 [2], Seite 251-260.
- Schweer, J.; Loschelder, H. und Link, G. (2006): A promoter switch that can rescue a plant sigma factor mutant, *FEBS Lett* 580 [28-29], Seite 6617-6622.
- Sharp, P. A. (1991): "Five easy pieces", *Science* 254 [5032], Seite 663.
- Sheen, J. (1999): C₄ Gene Expression, *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50, Seite 187-217.
- Shevchenko, A.; Wilm, M.; Vorm, O. und Mann, M. (1996): Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels, *Anal Chem* 68 [5], Seite 850-858.
- Singh, R. N.; Saldanha, R. J.; D'Souza, L. M. und Lambowitz, A. M. (2002): Binding of a group II intron-encoded reverse transcriptase/maturase to its high affinity intron RNA binding site involves sequence-specific recognition and autoregulates translation, *J Mol Biol* 318 [2], Seite 287-303.
- Sitte, P.; Ziegler, H.; Ehrendorfer, F. und Bresinsky, A. (1998): Strasburger - Lehrbuch der Botanik für Hochschulen, 34. Auflage, Sitte, P., Fischer, Stuttgart, ISBN: 3-437-25500-2.
- Small, I. D. und Peeters, N. (2000): The PPR motif - a TPR-related motif prevalent in plant organellar proteins, *Trends Biochem Sci* 25 [2], Seite 46-47.
- Southern, E. M. (1975): Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis, *J Mol Biol* 98 [3], Seite 503-517.
- Stahl, D. J.; Rodermel, S. R.; Bogorad, L. und Subramanian, A. R. (1993): Co-transcription pattern of an introgressed operon in the maize chloroplast genome comprising four ATP synthase subunit genes and the ribosomal *rps2*, *Plant Mol Biol* 21 [6], Seite 1069-1076.
- Stegemann, S.; Hartmann, S.; Ruf, S. und Bock, R. (2003): High-frequency gene transfer from the chloroplast genome to the nucleus, *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 [15], Seite 8828-8833.
- Sugita, M.; Shinozaki, K. und Sugiura, M. (1985): Tobacco chloroplast tRNA^{Lys}(UUU) gene contains a 2.5-kilobase-pair intron: An open reading frame and a conserved boundary sequence in the intron, *Proc Natl Acad Sci U S A* 82 [11], Seite 3557-3561.
- Sugiura, M.; Hirose, T. und Sugita, M. (1998): Evolution and mechanism of translation in chloroplasts, *Annu Rev Genet* 32, Seite 437-459.

- Svab, Z.; Hajdukiewicz, P. und Maliga, P. (1990): Stable transformation of plastids in higher plants, *Proc Natl Acad Sci U S A* 87 [21], Seite 8526-8530.
- Svab, Z. und Maliga, P. (1993): High-frequency plastid transformation in tobacco by selection for a chimeric *aadA* gene, *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 [3], Seite 913-917.
- Tanaka, M.; Wakasugi, T.; Sugita, M.; Shinozaki, K. und Sugiura, M. (1986): Genes for the eight ribosomal proteins are clustered on the chloroplast genome of tobacco (*Nicotiana tabacum*): similarity to the S10 and *spc* operons of *Escherichia coli*, *Proc Natl Acad Sci U S A* 83 [16], Seite 6030-6034.
- Till, B.; Schmitz-Linneweber, C.; Williams-Carrier, R. und Barkan, A. (2001): CRS1 is a novel group II intron splicing factor that was derived from a domain of ancient origin, *RNA* 7 [9], Seite 1227-1238.
- Tillich, M.; Lehwark, P.; Morton, B. R. und Maier, U. G. (2006): The evolution of chloroplast RNA editing, *Mol Biol Evol* 23 [10], Seite 1912-1921.
- Timmis, J. N.; Ayliffe, M. A.; Huang, C. Y. und Martin, W. (2004): Endosymbiotic gene transfer: organelle genomes forge eukaryotic chromosomes, *Nat Rev Genet* 5 [2], Seite 123-135.
- Toor, N.; Hausner, G. und Zimmerly, S. (2001): Coevolution of group II intron RNA structures with their intron-encoded reverse transcriptases, *RNA* 7 [8], Seite 1142-1152.
- Toor, N.; Keating, K. S.; Taylor, S. D. und Pyle, A. M. (2008): Crystal structure of a self-spliced group II intron, *Science* 320 [5872], Seite 77-82.
- Toor, N. und Zimmerly, S. (2002): Identification of a family of group II introns encoding LAGLIDADG ORFs typical of group I introns, *RNA* 8 [11], Seite 1373-1377.
- Turmel, M.; Otis, C. und Lemieux, C. (2005): The complete chloroplast DNA sequences of the charophycean green algae *Staurastrum* and *Zygnema* reveal that the chloroplast genome underwent extensive changes during the evolution of the Zygnematales, *BMC Biol* 3, Seite 22.
- Uniacke, J. und Zerges, W. (2007): Photosystem II assembly and repair are differentially localized in *Chlamydomonas*, *Plant Cell* 19 [11], Seite 3640-3654.
- Van Etten, W. J. und Janssen, G. R. (1998): An AUG initiation codon, not codon-anticodon complementarity, is required for the translation of unleadered mRNA in *Escherichia coli*, *Mol Microbiol* 27 [5], Seite 987-1001.
- Varet, A.; Hause, B.; Hause, G.; Scheel, D. und Lee, J. (2003): The *Arabidopsis NHL3* gene encodes a plasma membrane protein and its overexpression correlates with

- increased resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000, *Plant Physiol* 132 [4], Seite 2023-2033.
- Voelker, R. und Barkan, A. (1995): Two nuclear mutations disrupt distinct pathways for targeting proteins to the chloroplast thylakoid, *EMBO J* 14 [16], Seite 3905-3914.
- Vogel, J. und Börner, T. (2002): Lariat formation and a hydrolytic pathway in plant chloroplast group II intron splicing, *EMBO J* 21 [14], Seite 3794-3803.
- Vogel, J.; Börner, T. und Hess, W. R. (1999): Comparative analysis of splicing of the complete set of chloroplast group II introns in three higher plant mutants, *Nucleic Acids Res* 27 [19], Seite 3866-3874.
- Vogel, J.; Hübschmann, T.; Börner, T. und 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 [2], Seite 179-187.
- Wahl, M. C.; Will, C. L. und Lührmann, R. (2009): The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine, *Cell* 136 [4], Seite 701-718.
- Wakasugi, T.; Tsudzuki, T. und Sugiura, M. (2001): The genomics of land plant chloroplasts: Gene content and alteration of genomic information by RNA editing, *Photosynth Res* 70 [1], Seite 107-118.
- Wank, H.; SanFilippo, J.; Singh, R. N.; Matsuura, M. und Lambowitz, A. M. (1999): A reverse transcriptase/maturase promotes splicing by binding at its own coding segment in a group II intron RNA, *Mol Cell* 4 [2], Seite 239-250.
- Watkins, K. P.; Kroeger, T. S.; Cooke, A. M.; Williams-Carrier, R. E.; Friso, G.; Belcher, S. E.; van Wijk, K. J. und Barkan, A. (2007): A ribonuclease III domain protein functions in group II intron splicing in maize chloroplasts, *Plant Cell* 19 [8], Seite 2606-2623.
- Williams, P. M. und Barkan, A. (2003): A chloroplast-localized PPR protein required for plastid ribosome accumulation, *Plant J* 36 [5], Seite 675-686.
- Wobbe, L.; Schwarz, C.; Nickelsen, J. und Kruse, O. (2008): Translational control of photosynthetic gene expression in phototrophic eukaryotes, *Physiol Plant* 133 [3], Seite 507-515.
- Wolf, P. G.; Rowe, C. A.; Sinclair, R. B. und Hasebe, M. (2003): Complete nucleotide sequence of the chloroplast genome from a leptosporangiate fern, *Adiantum capillus-veneris* L, *DNA Res* 10 [2], Seite 59-65.
- Wolfe, K. H.; Morden, C. W. und Palmer, J. D. (1992): Function and evolution of a minimal plastid genome from a nonphotosynthetic parasitic plant, *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 [22], Seite 10648-10652.

- Woodson, J. D. und Chory, J. (2008): Coordination of gene expression between organellar and nuclear genomes, *Nat Rev Genet* 9 [5], Seite 383-395.
- Woodson, S. A. (2005): Structure and assembly of group I introns, *Curr Opin Struct Biol* 15 [3], Seite 324-330.
- Wostrikoff, K.; Girard-Bascou, J.; Wollman, F. A. und Choquet, Y. (2004): Biogenesis of PSI involves a cascade of translational autoregulation in the chloroplast of *Chlamydomonas*, *EMBO J* 23 [13], Seite 2696-2705.
- Wostrikoff, K. und Stern, D. (2007): Rubisco large-subunit translation is autoregulated in response to its assembly state in tobacco chloroplasts, *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 [15], Seite 6466-6471.
- Yamamoto, T.; Burke, J.; Autz, G. und Jagendorf, A. T. (1981): Bound Ribosomes of Pea Chloroplast Thylakoid Membranes: Location and Release *in Vitro* by High Salt, Puromycin, and RNase, *Plant Physiol* 67 [5], Seite 940-949.
- Yang, J.; Zimmerly, S.; Perlman, P. S. und Lambowitz, A. M. (1996): Efficient integration of an intron RNA into double-stranded DNA by reverse splicing, *Nature* 381 [6580], Seite 332-335.
- Zoschke, R.; Liere, K. und Börner, T. (2007): From seedling to mature plant: *Arabidopsis* plastidial genome copy number, RNA accumulation and transcription are differentially regulated during leaf development, *Plant J* 50 [4], Seite 710-722.
- Zoschke, R.; Nakamura, M.; Liere, K.; Sugiura, M.; Börner, T. und Schmitz-Linneweber, C. (2010): An organellar maturase associates with multiple group II introns, *Proc Natl Acad Sci U S A* 107 [7], Seite 3245-3250.
- Zoschke, R.; Ostersetzer, O.; Börner, T. und Schmitz-Linneweber, C. (2009): Analysis of the regulation of MatK gene expression, *Endocytobiosis Cell Res* 19, Seite 127-135.
- Zuker, M. (2003): Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction, *Nucleic Acids Res* 31 [13], Seite 3406-3415.
- Zurawski, G.; Bottomley, W. und Whitfeld, P. R. (1982): Structures of the genes for the β and ϵ subunits of spinach chloroplast ATPase indicate a dicistronic mRNA and an overlapping translation stop/start signal, *Proc Natl Acad Sci U S A* 79 [20], Seite 6260-6264.

Anhang

Tab. 1: Übersicht der P67-Insertionslinien. Positionsangaben aus eigener Sequenzierung: Start-ATG = Positionen + 1, + 2, + 3; *Arabidopsis*-Sequenz nach Lahmy et al. (2000), NCBI-Akzession: AJ243545; Maissequenz, NCBI-Akzession: NP_001130387; *A.th.* = *Arabidopsis thaliana*, Col = Columbia, Ler = Landsberg *erecta*, seq. = sequenziert, *Z.m.* = *Zea mays*.

Bezeichnung	Annotation (SIGnAL/NASC)	Position der Insertion		Organismus (Ökotyp)
		5' (nach)	3' (vor)	
<i>AtP67-1</i>	CSHL_GT20858	+ 402	+ 394	<i>A.th.</i> (Ler)
<i>AtP67-2</i>	SAIL_423_G09/N819547	+ 1857	+ 1858	<i>A.th.</i> (Col)
<i>ZmP67-1</i>	----	- 15	- 23	<i>Z.m.</i>
<i>ZmP67-1A</i>	----	- 15	+ 52	<i>Z.m.</i>
<i>ZmP67-2</i>	----	nicht seq.	+ 95	<i>Z.m.</i>
<i>ZmP67-3</i>	----	+ 346	+ 338	<i>Z.m.</i>

Tab. 2: Antikörperübersicht (AK = Antikörper, AS = Aminosäure, *A.th.* = *Arabidopsis thaliana*, Cyt *b₆f* = Cytochrom *b₆f*, GST = Glutathion-S-Transferase, Hämaggl. = Hämagglutinin, HRP = Meerrettichperoxidase, ID = Immunodetektion, IgG = Immunglobulin G, In = Influenzavirus, IP = Immunopräzipitation, K = Kaninchen, M = Maus, PS = Photosystem, Rib. = Ribosomen, S = Schaf, *S.j.* = *Schistosoma japonicum*, *S.o.* = *Spinacia oleracea*, UE = Untereinheit, Z = Ziege, *Z.m.* = *Zea mays*).

Antikörper	Epitop/Antigen (Komplex, Organismus)	Bezugsquelle/Hersteller, Verwendung (Arbeitsverdünnung), aus Organismus
AtpB-AK	AtpB (ATPase, <i>Z.m.</i>)	Prof. Dr. A. Barkan, ID (1:10000), K
AtpF-AK	AtpF (ATPase, <i>A.th.</i>)	Abcam (ab65382), ID (1:5000), K
D1-AK	D1 (PS II, <i>Z.m.</i>)	Prof. Dr. A. Barkan, ID (1:1000), K
GST-AK	GST (<i>S.j.</i>)	Sigma (G7781), ID (1:6000), K
HA-AK	AS 98 - 106 Hämaggl. (In)	Sigma (H3663), ID (1:500), IP, M
HA-AK-HRP	AS 98 - 106 Hämaggl. (In)	Sigma (H6533), ID nach IP (1:500), M
Mouse-HRP	IgG (M)	GE Healthcare (NXA931), ID (1:5000), S
P67-AK	C-Terminus P67 (<i>Z.m.</i>)	Eurogentec, ID (1:1000), IP, K
PetD-AK	PetD (Cyt <i>b₆f</i> , <i>Z.m.</i>)	Prof. Dr. A. Barkan, ID (1:2000), K
PsaD-AK	PsaD (PS I, <i>Z.m.</i>)	Prof. Dr. A. Barkan, ID (1:1000), K
Rabbit-HRP	IgG (K)	Sigma (A9169), ID (1:5000), Z
Rps5-AK	Rps5 (kl. UE Rib., <i>S.o.</i>)	Prof. Dr. S. Lerbs-Mache, ID (1:3000), K

Anhang

Tab. 3: Vektorenübersicht (Derivate dieser Vektoren wurden im Einzelnen beschrieben).

Bezeichnung	Hersteller/Bezugsquelle, Verwendung
pAC-DIVa-LacZ	Prof. Dr. A. Lambowitz (Singh et al., 2002), <i>matK-lacZ</i> -Fusionen
pACYC184	Prof. Dr. A. Lambowitz (Singh et al., 2002), <i>matK-lacZ</i> -Fusionen
pBluescript II SK (+)	Stratagene, Basisvektor für verschiedene Klonierungen
pET-15b	Novagen, Expression des P67-Epitops
pEX560	Prof. Dr. A. Lambowitz (Singh et al., 2002), CYT-18-Expression
pGEX-4T1	GE Healthcare, Basisvektor für die Proteinexpression
pmatM2pGEX	Dr. O. Ostersetzer-Biran, MatK-Expression (Zoschke et al., 2009)

Tab. 4: Übersicht der verwendeten Oligonukleotide (*A.th.* = *Arabidopsis thaliana*, Ex = Exon, Genotyp. = Genotypisierung, In = Intron, IP-Northern = Northern-Analyse von Immunopräzipitationen, *N.t.* = *Nicotiana tabacum*, rrT = Sonden-Primer für *Macroarrays* der radioaktiven reversen Transkription, rT = PCR-Primer der reversen Transkription, Seq. = Sequenzierung, T-DNA = Transfer-DNA, *Z.m.* = *Zea mays*). Die Oligonukleotide des *trnK*-Oligonukleotid-*Tiling-Arrays* sind bei Zoschke et al. (2010) gezeigt.

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Ziel	Verwendung
3'matK-Au-1	taatgtcgacgattgggtaaaaatgaaacctata gctgcagaagtagg	<i>N.t.</i> <i>matK</i>	Klonierung, Seq., Southern
3'matK-Au-2	taatgtcgatcatcttttggagccctcttgaacga atatatttc	<i>N.t.</i> <i>matK</i>	Genotyp., Klonierung, Seq.
3'matK-In-1	gatctggcgaattatcaattgattcattcttagatt tc	<i>N.t.</i> <i>matK</i>	Klonierung, Seq.
3'matK-In-2	gaaaatctaagaatgaatcaattgataattcgcca gatc	<i>N.t.</i> <i>matK</i>	Klonierung, Seq.
3'matKSeq-fw	aaagttgaatactcagttgattacccc	<i>N.t.</i> <i>matK</i>	Genotyp., Seq.
3'matKSeq-rev	cgagcttctctagtttggggg	<i>N.t.</i> <i>matK</i>	Genotyp., Seq.
5'matK-Au-1	ccgggtcgaccctcaaatgggtggtttccggtt ttc	<i>N.t.</i> <i>matK</i>	Klonierung, Seq.
5'matK-Au-2	taatgtcgacgatattaatcgtagaaaaacgga attccacaataaacg	<i>N.t.</i> <i>matK</i>	Klonierung, Seq.
5'matk-HA-Test-fw	caaactcttgttcaccccaaaaatg	<i>N.t.</i> <i>matK</i>	Genotyp., IP-Northern, Northern, rrT, Seq.
5'matk-HA-Test-rev	catttgataaccctcaaatcttccgctc	<i>N.t.</i> <i>matK</i>	Genotyp., Northern, rrT, Seq.
5'matK-In-1	ctttggattcttccaattgaaatcgatttgaac	<i>N.t.</i> <i>matK</i>	Klonierung, Seq.
5'matK-In-2	gttcaaatcgaattcaattggaagaatccaaa g	<i>N.t.</i> <i>matK</i>	Klonierung, Seq.
5'matKSeq-fw	gggacaagaacccttcccg	<i>N.t.</i> <i>matK</i>	Genotyp., Seq.
5'matKSeq-rev	cattgttcctagatgggtataaaaccg	<i>N.t.</i> <i>matK</i>	Genotyp., IP-Northern, Northern, Seq.
5'matkSouthfw	gaaccaaaagacggaagatttgaggg	<i>N.t.</i> <i>trnK</i> (UUU) Ex 1	Southern
5'matkSouthrev	cgggttgctaactcaacggttagagtactc	<i>N.t.</i> <i>trnK</i> (UUU) In	Southern

Anhang

5'matk-Test-rps16	taaattaaggaaatacaaaaagggggg	<i>N.t.</i>	<i>rps16</i>	Genotyp.
aadAforQ	agcccgctcacttgaagc	--	<i>aadA</i>	Genotyp., Seq.
aadAfw1	ggaaactcggcttcccctgg	--	<i>aadA</i>	Genotyp., Seq
aadAfw2	ggtagtggcaataactgcaggcatg	--	<i>aadA</i>	Genotyp.,Seq
aadA-LB-rev	ccattctcattgaacgacggcg	--	<i>aadA</i>	Genotyp., Seq.
aadali	gaagcggttatcgccaag	--	<i>aadA</i>	Genotyp., Seq.
aadAoutfor	tatcagcccgctcacttgaagc	--	<i>aadA</i>	Genotyp., Seq.
aadA-RB-for	caccgcggtggagctcgg	--	<i>aadA</i>	Genotyp., Seq.
aadArev1	ctccaactgatctgcgcgcg	--	<i>aadA</i>	Genotyp., Seq.
aadArev2	ccgagctccaccgcggtg	--	<i>aadA</i>	Genotyp., Seq.
aadArev3	cgattgagttacatccgcttag	--	<i>aadA</i>	Genotyp., Seq.
aadArev4	gcacatcgtaattataagacagg	--	<i>aadA</i>	Genotyp., Seq.
aadArev5	catgcagcagcaagttctgg	--	<i>aadA</i>	Genotyp., Seq.
aadArevQ	gtgatctgcctttcacgtag	--	<i>aadA</i>	Genotyp., Seq.
aadoutrev	actgcggagcgtacaatg	--	<i>aadA</i>	Genotyp., Seq.
ActAtcDNAfw	cttaccgagcctccttaacc	<i>A.th.</i>	<i>Actin8</i>	rT
ActAtcDNArev	ctgctgttggtggaacatgtaac	<i>A.th.</i>	<i>Actin8</i>	rT
atpF_In_fw	tccataatccctcccgaacc	<i>N.t.</i>	<i>atpF</i> In	Northern, rT, <i>Slot-Blot</i>
atpF_In_rev	gacgcagcatggactctttctacc	<i>N.t.</i>	<i>atpF</i> In	Northern, rT, <i>Slot-Blot</i>
atpFex2fw	cccaacatgccaatatggcactaatgg	<i>N.t.</i>	<i>atpF</i> Ex 2	Northern
atpFex2rev	cagaagaactgcgtggaggggc	<i>N.t.</i>	<i>atpF</i> Ex 2	Northern
BamPPR52rev	atgggatcctacacagttactagtctgatgccgc	<i>A.th.</i>	<i>P67</i>	<i>P67</i> -Klonierung (Epitop)
CAB3_fw	cctccacaatggctctctctccc	<i>A.th.</i>	<i>CAB3</i>	<i>LhcB</i> -Sonde (GUN)
CAB3_rev	cccatgctgtgtg	<i>A.th.</i>	<i>CAB3</i>	<i>LhcB</i> -Sonde (GUN)
clpP_In_1_fw	gcgcttttgatgcatacgg	<i>N.t.</i>	<i>clpP</i> In 1	rrT
clpP_In_1_rev	cggcgcatctttaccg	<i>N.t.</i>	<i>clpP</i> In 1	rrT
clpPIn2 fw	cgctctacaagaaattgacctcc	<i>N.t.</i>	<i>clpP</i> In 2	rrT, <i>Slot-Blot</i>
clpPIn2 rev	ctgtatcgagagatgtagatgagataagggg	<i>N.t.</i>	<i>clpP</i> In 2	rrT, <i>Slot-Blot</i>
Ds3-2	cgattaccgtatttatcccgttc	--	Ds-Element	Genotyp. (CSHL)
Ds5-1	gaaacggctcggaaactagctctac	--	Ds-Element	Genotyp., Seq. (CSHL)
eomu1	gcctcatttcgctgaatccc	--	Mu-Element	Mu-Screen
eomu2	gcctctatttcgctgaatccg	--	Mu-Element	Mu-Screen
EoMu-Mix	gcctcatttcgctgaatccc & gcctctatttcgctgaatccg (1:1)	--	Mu-Element	Mu-Screen
HA-Tag_fw	ccctatgatgttccgattatgctgg	--	HA-Tag	Genotyp.
HA-Tag_rev	ccagcataatcaggaacatcataagg	--	HA-Tag	Genotyp.

Anhang

lacZrev1	gccagctggcgaaaggggg	--	<i>lacZ</i>	Seq.
lacZrev2	gttgggtaaccgagggtttccc	--	<i>lacZ</i>	Seq.
LB1	gcctttcagaatgataaatagccttgcttc	--	T-DNA (SAIL)	Genotyp. (SAIL)
matK_Mut-fw_1	gttccccggattcgaaccggaactagtcgga tggagtagataagtcc	<i>N.t.</i>	<i>matK</i>	<i>matK</i> -Mutagenese
matK_Mut-fw_10	acgggaatgattgataattggtttatagatcc ttcctgtgtaaaagcacagagaacaatgacattg ccaaaaattgacaaggtaaaatttcattta	<i>N.t.</i>	<i>matK</i>	<i>matK</i> -Mutagenese
matK_Mut-fw_11	ttcatcaaaagaaacgctccctttgaagccagaat ggattttcctgatacctaacaatgcatgaaag gatccttgaataaccgggatta	<i>N.t.</i>	<i>matK</i>	<i>matK</i> -Mutagenese
matK_Mut-fw_2	ttgtaataaaaaataatgtaatttaaaftaata aacaagtaaaagcccctcccaagccgtgcttg cattttcattgcacagcgtttccctatg	<i>N.t.</i>	<i>matK</i>	<i>matK</i> -Mutagenese
matK_Mut-fw_3	tatacatcagttcctttctatagaattagaaaga ctftaaaaagtgaatactcagttgatttaccctta attactatcaatcaactttcagaa	<i>N.t.</i>	<i>matK</i>	<i>matK</i> -Mutagenese
matK_Mut-fw_4	tagtgaattttttatctctcatcatttagaaca attccatttagaaaatctaacccgaatcattgat aattcggcagatcattgatacaaac	<i>N.t.</i>	<i>matK</i>	<i>matK</i> -Mutagenese
matK_Mut-fw_5	tcatcaataaccaaatccgacttctatatactcc ccacaatcagaagaagctcgtgggaaggtca aagaaagaacctcttctccgacgttaagaatt	<i>N.t.</i>	<i>matK</i>	<i>matK</i> -Mutagenese
matK_Mut-fw_6	cttcaataatccgagcccactcttcaaaaa gtcgtacagacttttgtttccgagctaaagt ctagcacaagaagctcaagtataactt	<i>N.t.</i>	<i>matK</i>	<i>matK</i> -Mutagenese
matK_Mut-fw_7	tattcgataaaagtcttttttgaagatccgcta taataatgaaaaagatttctgcatatagcccaaa tcggtcaataatattagaactcgataaa	<i>N.t.</i>	<i>matK</i>	<i>matK</i> -Mutagenese
matK_Mut-fw_8	tcggaccaaacgggtttactaatgggatgccta aatcgggtacaaaagtgtcttagctaatgatcca atcaaatcaataatggaacaagggatcga	<i>N.t.</i>	<i>matK</i>	<i>matK</i> -Mutagenese
matK_Mut-fw_9	acttctaattgcattattgattagaatgaattttc aacattgactactgaccattgaagatttagtcg cacactgaaaagatagccataaagtc	<i>N.t.</i>	<i>matK</i>	<i>matK</i> -Mutagenese
matK_Mut-rev_10	tcaacttttaagcttcttaattctataagaag gaactgatgatacataggaaaagccgtgca atgaaaaatgcaagcacggcttggggaggg	<i>N.t.</i>	<i>matK</i>	<i>matK</i> -Mutagenese
matK_Mut-rev_11	gtcttacttgittatttaattgaatttaacattatt tatttaacaaggaacttactactccatccgacta gttccgggtcgaatcccgggcaac	<i>N.t.</i>	<i>matK</i>	<i>matK</i> -Mutagenese
matK_Mut-rev_2	tatcaaggaaaaatccattctggcttcaaaaggga cgtttctttgatgaataatggaaatttaccctgt caattttggcaatgctattgttctctgt	<i>N.t.</i>	<i>matK</i>	<i>matK</i> -Mutagenese
matK_Mut-rev_3	gcttcacacaggaagatccatataaacaat atccaatcattcccgactttatgggctatcttc aagtgtcgaactaaatcctcaatggtacg	<i>N.t.</i>	<i>matK</i>	<i>matK</i> -Mutagenese
matK_Mut-rev_4	tagtcaaatgttagaaaatcatttcaatcaataat gcaaitaagaagttcgataccctgttccaattatt gatttgattggatcattagctaaagca	<i>N.t.</i>	<i>matK</i>	<i>matK</i> -Mutagenese
matK_Mut-rev_5	aactttgtaccgatttagggcatcccattagtaaa ccggtttgtccgatttaccagattctaattattg accgatttggcgatatgcagaaatc	<i>N.t.</i>	<i>matK</i>	<i>matK</i> -Mutagenese
matK_Mut-rev_6	ttttcattattatagcggatctccaaaaaaga ctttatcgaataaagtataacttgagcttctgt gctagaacttagctcggaaacacaa	<i>N.t.</i>	<i>matK</i>	<i>matK</i> -Mutagenese
matK_Mut-rev_7	aagtactgtacgcacttttgaagagtcgggct cggaaatttggagaatcttaacgtcggaga agaggtcttcttggacttccacagact	<i>N.t.</i>	<i>matK</i>	<i>matK</i> -Mutagenese
matK_Mut-rev_8	tcttctgatttggggagatataagaatcggatt tggatttggatgattttgtatcaatgatctggcg aattatcaatgattcgggcttagattt	<i>N.t.</i>	<i>matK</i>	<i>matK</i> -Mutagenese

Anhang

matK_Mut-rev_9	ctaaatggaaattgtttctaaatgatgaagagat aaaaaaattcactattctgaaatggtgattgtaata gtaaftaaggggtaaatcaactgagtat	<i>N.t.</i>	<i>matK</i>	<i>matK</i> -Mutagenese
matK-ATGfw	gtaatgcatatgggatttctccattgaaatcgat ttgaaccaaagacggagatttgcataatgaagg tt	<i>N.t.</i>	<i>matK</i>	<i>matK</i> -Antisense, <i>matK</i> - Überexpression
matK-ATGrev	aaccttcatatgcaaaaatctccgtcttggttcaa atcgaatttcaaatggaagaatcccatatgcatt ac	<i>N.t.</i>	<i>matK</i>	<i>matK</i> -Antisense, <i>matK</i> - Überexpression
matK-psbA 5'UTR fw	acatacaccttgggtgacacgagtataatgcat g	<i>N.t.</i>	<i>psbA</i> 5'UTR	Southern
MatKZmAutofw2	taataagcttctatgattagactccctctctcc	<i>N.t.</i>	<i>matK</i>	Klonierung
MatKZmAutofw4	taataagcttcaaaagcaaaagcggattggcct gc	<i>N.t.</i>	<i>matK</i>	Klonierung
MatKZmAutofw7	taataagcttggaaaaatcgaagggtattcag aaaaacagaaatc	<i>N.t.</i>	<i>matK</i>	Klonierung
MatKZmAutorev6	taatctgcagggtgatccaacaatcgatcttgg agg	<i>N.t.</i>	<i>matK</i>	Klonierung
MunI-HA-Tagfw	tctcaattgatccttatgatgttctgattatgctg gatatccttatgatgtaccagattatgctggatc catacgatgtacctgattatgcttaatgacaattg ctt	--	HA-Epitop	Erstellung des HA-Tags
MunI-HA-Tagrev	tctcaattgatccttatgatgttctgattatgctg ctggatccttatgatgtaccagattatgctggat atccatagatgtacctgattatgctcaattgtctt	--	HA-Epitop	Erstellung des HA-Tags
NdeI-aadAfw	catatgctgtactcaagctcgaacgaaggtc	--	<i>aadA</i>	Klonierung
NdeI-aadArev	catatgctgtcatgctcagttatttccaac	--	<i>aadA</i>	Klonierung
NdePPR52for	cttcatatggccggcttcaagccaacatc	<i>A.th.</i>	<i>P67</i>	<i>P67</i> -Klonierung (Epitop)
ndhA_In_fw	ctcctttctcagaaaaggcc	<i>N.t.</i>	<i>ndhA</i> In	rT
ndhA_In_rev	ttgtcatgatagcttgaagcgg	<i>N.t.</i>	<i>ndhA</i> In	rT
ndhB_In_fw	ctcgcgtatgtataagaccgaatcc	<i>N.t.</i>	<i>ndhB</i> In	rT
ndhB_In_rev	cctacaaggatcggactaatgacg	<i>N.t.</i>	<i>ndhB</i> In	rT
Nt 18S fw	acccaatcctgacacggggagg	<i>N.t.</i>	<i>Rrn18</i>	Northern
Nt 18S rev	gcaacatccgccgatccctgg	<i>N.t.</i>	<i>Rrn18</i>	Northern
NtMatKSeq fw	ccgtcttggttcaaatcgaatttcaaatgg	<i>N.t.</i>	<i>matK</i>	Kolonie-PCR, Seq.
NtMatKSeq rev	ccatttgaattcgatttgaacaaagcgg	<i>N.t.</i>	<i>matK</i>	Kolonie-PCR, Seq.
NtpsBArev2	ccaaggtcgataccagacgg	<i>N.t.</i>	<i>psbA</i>	Genotyp.
p67-Nest1fw	gtctgggtaatcccaaaagcccc	<i>A.th.</i>	<i>P67</i>	PCR, rT
p67-Nest1rev	gccatagtgacattatcaggctcacatcc	<i>A.th.</i>	<i>P67</i>	PCR, rT
p67-Nest2fw	ctgagtctcttgacgcgtgaagcc	<i>A.th.</i>	<i>P67</i>	PCR, rT
p67-Nest2rev	ccggtttaatccctctctcaagcatttc	<i>A.th.</i>	<i>P67</i>	PCR, rT
petBIn fw	cagacctcgtgccgggc	<i>N.t.</i>	<i>petB</i>	rT, Slot-Blot
petBIn rev	atatcaagttggcgcagctgctc	<i>N.t.</i>	<i>petB</i>	rT, Slot-Blot
petD_In_fw	gtgtcttggccaatgcgg	<i>N.t.</i>	<i>petD</i> In	rT
petD_In_rev	gggtcgtctcagaccttcaattgg	<i>N.t.</i>	<i>petD</i> In	rT
pGEX4T1_fw	ctggttccgcgtggatccccgaattccccgggt cgactcgag	--	pGEX4T1	Klonierung

Anhang

pGEX4T1_rev	tcagtcacgatcgccgctcgagtcgacccg ggaattcc	--	pGEX4T2	Klonierung
PPR52-GFP_fw	taattcatgacctctctctctgcaatc	<i>A.th.</i>	<i>P67</i>	Genotyp., Seq. (CSHL)
PPR52-GFP_fw-neu	taattcatgacatttcacatcatgttctctccc	<i>A.th.</i>	<i>P67</i>	rT (CSHL)
PPR52-GFP-Seq-for3	cggacgacagattttgtggg	<i>A.th.</i>	<i>P67</i>	rT (SAIL)
PPR52-GFP-Seq-rev1	ggtaacattgtagagaatcactccctg	<i>A.th.</i>	<i>P67</i>	Genotyp., Seq., rT (CSHL)
PPR52-GFP-Seq-rev3	caccggattcaagagccgc	<i>A.th.</i>	<i>P67</i>	rT (SAIL)
psbA fw	gaaagcgaagcctatgggg	<i>N.t.</i>	<i>psbA</i>	rrT
psbA rev	ctaagctcccactcacgacc	<i>N.t.</i>	<i>psbA</i>	rrT
psbD_fw	gcccttgtaagttaccaagacg	<i>N.t.</i>	<i>psbD</i>	rrT
psbD_rev	ggagagcaacaaaagccacagacc	<i>N.t.</i>	<i>psbD</i>	rrT
psbE_fw	ggaagcacaggagaacgttcg	<i>N.t.</i>	<i>psbE</i>	rrT
psbE_rev	ccaaggatcaaacggcc	<i>N.t.</i>	<i>psbE</i>	rrT
rbcL_fw	ggacaactgtatggaccgatgg	<i>N.t.</i>	<i>rbcL</i>	rrT
rbcL_rev	ccgcaagacattcataaacagc	<i>N.t.</i>	<i>rbcL</i>	rrT
rpl16_In_fw	ccatcttactacagaaccggacg	<i>N.t.</i>	<i>rpl16</i> In	rrT
rpl16_In_rev	gatctgagaagtcacgagttaacc	<i>N.t.</i>	<i>rpl16</i> In	rrT
rpl2_In_fw	ccccttccaaactgtacaagc	<i>N.t.</i>	<i>rpl2</i> In	Northern, rrT
rpl2_In_rev	caccgacagaaccggaagc	<i>N.t.</i>	<i>rpl2</i> In	Northern, rrT
rpl2ex2fw	caagtgcaggataacccaagggg	<i>N.t.</i>	<i>rpl2</i> Ex 2	Northern
rpl2ex2rev	gacaattagctagagcagcgggtgc	<i>N.t.</i>	<i>rpl2</i> Ex 2	Northern
rpoC1_In_fw	gggataggattctatagatctccc	<i>N.t.</i>	<i>rpoC1</i> In	rrT
rpoC1_In_rev	taaccatcgagggtgaagtcggg	<i>N.t.</i>	<i>rpoC1</i> In	rrT
rps12_In_1_fw	ctaataaccaacgaatgcaagtgc	<i>N.t.</i>	<i>rps12</i> In 1	rrT
rps12_In_1_rev	tttcacgctcatgtcacgtcg	<i>N.t.</i>	<i>rps12</i> In 1	rrT
rps12ex2fw	cgcccttgtgacgatctttactcc	<i>N.t.</i>	<i>rps12</i> Ex 2	Northern
rps12ex2rev	ccccaaaaaaccaactctgccttacg	<i>N.t.</i>	<i>rps12</i> Ex 2	Northern
rps12In2 fw	cccaataacgaaagttcgttaaggg	<i>N.t.</i>	<i>rps12</i> In 2	Northern, rrT
rps12In2 rev	tatcgtttccctcccttcc	<i>N.t.</i>	<i>rps12</i> In 2	Northern, rrT
rps16_In_fw	cggcaattcatttatgagcg	<i>N.t.</i>	<i>rps16</i> In	rrT, Slot-Blot
rps16_In_rev	gaaggacaggatccgttgg	<i>N.t.</i>	<i>rps16</i> In	rrT, Slot-Blot
rrn16 fw	gggaagtgggtttccagtgg	<i>N.t.</i>	<i>rrn16</i>	rrT
rrn16 rev	ttacgccaatcattccgg	<i>N.t.</i>	<i>rrn16</i>	rrT
rrn23_fw	ggatacctaggcaccagagacg	<i>N.t.</i>	<i>rrn23</i>	rrT
rrn23_rev	cacggattccacgtgcc	<i>N.t.</i>	<i>rrn23</i>	rrT
RT-p67	cgcccgtaaagcatcaatcatagc	<i>A.th.</i>	<i>P67</i>	PCR, rT

Anhang

SAILfw	gaggaaatcggtaaactcattggctgtgtcg	<i>A.th.</i>	<i>P67</i>	Genotyp., Seq. (SAIL)
SAILrev	ccctatctggggcttcagaaaggagc	<i>A.th.</i>	<i>P67</i>	Genotyp., Seq. (SAIL)
SAIL-RB 100	aaactatcagtggttgacaggatattggcggg	--	T-DNA (SAIL)	Genotyp., Seq. (SAIL)
SAIL-T-DNA-RB 500	cctcgggaattgctaccgagctcg	--	T-DNA (SAIL)	Genotyp. (SAIL)
trnAex1	ttgcaagagcggagctctaccaactgagctatat cccc	<i>N.t.</i>	<i>trnA</i> (UGC) Ex 1	Northern
trnA-In fw2	gaggtaggatgggcagttgg	<i>N.t.</i>	<i>trnA</i> (UGC) In	Northern, rrT, <i>Slot-Blot</i>
trnA-In rev2	tgagagcggacagctaagc	<i>N.t.</i>	<i>trnA</i> (UGC) In	Northern, rrT, <i>Slot-Blot</i>
trnEYD_fw	gactgacgggctcgaacc	<i>N.t.</i>	<i>trnEYD</i>	rrT
trnEYD_rev	cagcggggattcgaattcc	<i>N.t.</i>	<i>trnEYD</i>	rrT
trnG_(UCC)_In_fw	ccctaaatgtaaaagggtcctcg	<i>N.t.</i>	<i>trnG</i> (UCC) In	Northern, rrT, <i>Slot-Blot</i>
trnG_(UCC)_In_rev	ggaaaagggtttgttccacc	<i>N.t.</i>	<i>trnG</i> (UCC) In	Northern, rrT, <i>Slot-Blot</i>
trnG-UCCex2	agcgggtagcgggaatcgaaccgcacgtta gcttggaaaggctaggg	<i>N.t.</i>	<i>trnG</i> (UCC) Ex 2	Northern
trnI(GAU)In fw	ctttcgatcactcgtgggatc	<i>N.t.</i>	<i>trnI</i> (GAU) In	Northern, rrT
trnI(GAU)In rev	ccctcttctaccctggc	<i>N.t.</i>	<i>trnI</i> (GAU) In	Northern, rrT
trnIex2	tggccatcctggactgaaccagagacctcgc cc	<i>N.t.</i>	<i>trnI</i> (GAU) Ex 2	Northern
trnKex2	tgggttcccgggattcgaaccggaactagtc gg	<i>N.t.</i>	<i>trnK</i> (UUU) Ex 2	Northern
trnL_(UAA)_In_fw	ggcaatcctgagccaaatcc	<i>N.t.</i>	<i>trnL</i> (UAA) In	rrT
trnL_(UAA)_In_rev	ccggtattgacatgtagaacggg	<i>N.t.</i>	<i>trnL</i> (UAA) In	rrT
trnV(UAC)In fw	gataaggaaatgctccatgtgc	<i>N.t.</i>	<i>trnV</i> (UAC) In	Northern, rrT
trnV(UAC)In rev	gagggaaacatagcctgacaaag	<i>N.t.</i>	<i>trnV</i> (UAC) In	Northern, rrT
trnVex2	tagggctatacggactcgaaccgtagacctctc g	<i>N.t.</i>	<i>trnV</i> (UAC) Ex 2	Northern
ycf3_In_1_fw	tctcgttccagaaccgtac	<i>N.t.</i>	<i>ycf3</i> In 1	rrT
ycf3_In_1_rev	ctcgttctcctttgataccc	<i>N.t.</i>	<i>ycf3</i> In 1	rrT
ycf3_In_2_fw	ctcatggtatcccagtttagg	<i>N.t.</i>	<i>ycf3</i> In 2	rrT
ycf3_In_2_rev	gggccgatacaataaactgcg	<i>N.t.</i>	<i>ycf3</i> In 2	rrT
ZmMatKKolfw	cccgttggactgattatcagattggg	<i>N.t.</i>	<i>matK</i>	Kolonie-PCR
ZmMatKKolrev	ccaatacactcactgtgtgatccatgg	<i>N.t.</i>	<i>matK</i>	Kolonie-PCR
ZmPPR52-1/3-5'	tccaaccacaatggcacaag	<i>Z.m.</i>	<i>P67</i>	Mu-Screen, Seq.
ZmPPR52-4-3'	ctgtcgaaccactcgcagg	<i>Z.m.</i>	<i>P67</i>	Mu-Screen, Seq.
ZmPPR52-4-3'a	cgagaaggtggcgtgtcgg	<i>Z.m.</i>	<i>P67</i>	Mu-Screen, Seq.
ZmPPR52-4-3'b	tctacagcggactcgggtgtctcg	<i>Z.m.</i>	<i>P67</i>	Mu-Screen, Seq.
ZmPPR52-4-3'c	ggaggcggagattggccg	<i>Z.m.</i>	<i>P67</i>	Mu-Screen, Seq.
ZmPPR52-4-3'd	cctgtgccatttgggttgaatcag	<i>Z.m.</i>	<i>P67</i>	Genotyp., Seq.
ZmPPR52-4-3'e	ccacaggaacctcgtgttctg	<i>Z.m.</i>	<i>P67</i>	Genotyp., Seq.
ZmPPR52-4-5'a	ccacgaactgacggacagagagg	<i>Z.m.</i>	<i>P67</i>	Mu-Screen, Seq.

Anhang

ZmPPR52-4-5 ^b	ccccttatccaaccaacgttg	Z.m.	P67	Mu-Screen, Seq.
ZmPPR52-4-5 ^c	caccaaccctctcttgatcatatcc	Z.m.	P67	Mu-Screen, Seq.
ZmPPR52-4-5 ^d	aactaaggtgtaatggatcacgatcc	Z.m.	P67	Genotyp., Seq.
ZmPPR52-4-5 ^e	tgtagagtacattagcacccttattcc	Z.m.	P67	Genotyp., Seq.

Tab. 5: Übersicht der verwendeten Software.

Programm	Verwendung; Version; Anbieter bzw. Verfügbarkeit im WWW
Acrobat Professional	Erstellung und Bearbeitung von Text; 7.0; Adobe [®]
BioEdit	Multiple Sequenzvergleiche; 7.0.9.0; Ibis Biosciences, http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html
BLAST	Sequenz- und Homologieabgleiche (Altschul et al., 1997), 2.2.16, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST
EndNote	Verarbeitung von Literaturdatenbanken; X1.0.1; Thomson Reuters
GenePix Pro	Quantifizierung und Auswertung von <i>Microarray</i> -Signalen; 6.0; Molecular Devices
GPRAna	Quantifizierung und Auswertung von <i>Microarray</i> -Signalen; http://www.indiji.com/gprana.html
Lasergene-SeqMan-Pro	Auswertung von Sequenzierdaten; 7.1.0; DNASTAR
Mfold	Berechnung von RNA-Sekundärstrukturen (Mathews et al., 1999; Zuker, 2003); http://mfold.bioinfo.rpi.edu/cgi-bin/rna-form1.cgi
Multalin	Multiple Sequenzvergleiche (Corpet, 1988); http://bioinfo.genotoul.fr/multalin/
Office Professional	Erstellung und Bearbeitung von Text Grafiken, Abbildungen, Tabellen, Kalkulationen; Word, Excel, Power Point, Plus 2007; Microsoft [®]
Oligo-Calc	Berechnung der Schmelztemperaturen von Oligonukleotiden; http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html
ORF Finder	Identifikation offener Leserahmen; http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html
Photoshop	Erstellung/Bearbeitung von Grafiken und Abbildungen; CS2; Adobe [®]
PlantGDB BLAST	Sequenz- und Homologieabgleiche; (Altschul et al., 1997); http://www.plantgdb.org/cgi-bin/blast/PlantGDBblast
POGs	Suche nach PPR-Orthologen (<i>Putative Orthologous Groups</i>); http://pogs.uoregon.edu
Predotar	Vorhersagen subzellulärer Lokalisationen von Proteinen; http://urgi.versailles.inra.fr/predotar/predotar.html
Primer 3	<i>Primer</i> -Design für den Mu-Screen; http://chloroplast.uoregon.edu/cgi-bin/primer/primer3.cgi

Anhang

PROTEIN CALCULATOR	Berechnung von Molekülmasse und isoelektrischem Punkt von Proteinen; 3.3; http://www.scripps.edu/~cdputnam/protcalc.html
Quantity One	Quantifizierung und Analyse von Radioaktiv- und Chemilumineszenzsignalen; 4.6.3; Bio-Rad
SIGnAL	Suche nach Transfer-DNA-Insertions- bzw. CSHL-Transposon-Linien (T-DNA-Express), Recherche von Genmodellen; http://signal.salk.edu/
TAIR	Suche nach Transfer-DNA-Insertions- bzw. CSHL-Transposon-Linien, Recherche von Genmodellen; http://www.arabidopsis.org/
TargetP	Vorhersagen subzellulärer Lokalisationen von Proteinen; http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/
TPRpred	PPR-Domänenstrukturvorhersage (Karpenahalli et al., 2007); http://toolkit.tuebingen.mpg.de/tpred

Tab. 6: Anbieterliste.

Abcam	Abcam Inc., Cambridge, MA, USA
Adobe	Adobe Systems Incorporated, San Jose, CA, USA
Amersham Biosciences	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
Applied Biosystems	Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA
B. Braun	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Beckman	Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA
Bio-Rad	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
bsb11 biotech	bsb11 biotech service blu, Schauenburg, Deutschland
Camena	Camena, Lauenau, Deutschland
Cole-Parmer	Cole-Parmer Instrument Company, IL, USA
Colgate-Palmolive	Colgate-Palmolive GmbH, Gelsenkirchen, Deutschland
Corning	Corning Inc., Acton, MA, USA
CSHL	Cold Spring Harbor, NY, USA
DNASTAR	DNASTAR, Inc., Madison, WI USA
Duchefa	Duchefa Biochemie B.V., Haarlem, Niederlande
DVD	Deutsche Vermiculite Dämmstoff-GmbH, Sprockhövel, Deutschland
Eurofins MWG Operon	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland
Eurogentec	Eurogentec Deutschland GmbH, Köln, Deutschland
Fermentas	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
Franz Eckert GmbH	Franz Eckert GmbH, Waldkirch, Deutschland
frux	Einheitserde- und Humuswerke, Gebr. Patzer GmbH & Co. KG, Sinnatal-Jossa, Deutschland
GE Healthcare	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
GenScript	GenScript USA Inc., Piscataway, NJ, USA
Heraeus	Heraeus, Hanau, Deutschland

Anhang

Ibis Biosciences	Ibis Biosciences, Carlsbad, CA, USA
Invitrogen	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Merck	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Microsoft	Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland
Millipore	Millipore Corp., Bedford, MA, USA
Molecular Devices	Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA
NASC	Nottingham <i>Arabidopsis</i> Stock Centre, Loughborough, Großbritannien
NEB	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
neoLab	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg, Deutschland
Novagen	Merck Chemicals Ltd., Nottingham, Großbritannien
peqLab	peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
PerkinElmer	PerkinElmer LAS (Deutschland) GmbH, Rodgau, Deutschland
QIAGEN	QIAGEN, Hilden, Deutschland
Roche	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Roth	C. Roth GMBH & Co, Karlsruhe, Deutschland
SAKRET	SAKRET Trockenbaustoffe Europa GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland
Scotts	Scotts International B.V., Geldermalsen, Niederlande
Serva	Serva Feinbiochemika, Heidelberg, Deutschland
Sigma	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA
SMB	Services in Molecular Biology GmbH, Rüdersdorf, Deutschland
Stratagene	Stratagene, La Jolla, CA, USA
TAKARA	TAKARA BIO INC., Otsu, Japan
Thermo Fisher	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Thomson Reuters	Thomson Reuters Corp., New York, NY, USA
USF	USF, Seral Reinstwassersysteme GmbH, Deutschland
Veolia	Veolia Water Solutions & Technologies, Saint Maurice, Frankreich
Whatman	Whatman Paper, Maidstone, Großbritannien
Zinsser	Zinsser Analytic GmbH, Frankfurt a.M., Deutschland

Abkürzungen

2-MeEtOH	2-Mercaptoethanol
A, C, G, T, U	Bausteine der DNA/RNA: Adenin, Cytosin, Guanin, Thymin, Uracil
<i>A. bideist</i>	deionisiertes, destilliertes Wasser (<i>Aqua bidestillata</i>)
<i>A.th.</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserum Albumin
bzw.	beziehungsweise
° C	Grad Celsius
ca.	zirka
cDNA	durch reverse Transkription erzeugte DNA (<i>complementary DNA</i>)
Ci	Curie
CMS	zytoplasmatische männliche Sterilität
Col	Ökotyp Columbia (<i>Arabidopsis thaliana</i>)
CSHL	Cold Spring Harbor Laboratory
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
cv.	Cultivar
Cyt <i>b₆f</i>	Cytochrom <i>b₆f</i>
d	Tag(e)
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DIP-Chip	DNA-Immunopräzipitation und Chip-Hybridisierung
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Gemisch aus dATP, dCTP, dGTP, dTTP
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
et al.	und andere (et alii, et aliae, et alia)
EtBr	Ethidiumbromid
etc.	et cetera
EtOH	Ethanol
g	Erdbeschleunigung bzw. Gramm
GST	Glutathion-S-Transferase
GUN	<i>Genomes uncoupled</i>
GVO	Gentechnisch veränderter Organismus
h	Stunde(n)
H ₃ PO ₄	Phosphorsäure
HA	Hämagglutininepitop

Anhang

HCl	Salzsäure
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl] Piperazin-N'-[2-Ethansulfonsäure]
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
I	Inosin
IgG	Immunglobulin G
inkl.	inklusive
IP	Immunopräzipitation
IR	invertierte Sequenzwiederholung des Plastoms (<i>inverted repeats</i>)
J	Joule
KAc	Kaliumacetat
Kap.	Kapitel
kb	Kilobasenpaare
KCl	Kaliumchlorid
kl.	kleine/r/s
knt	Kilonukleotide
KOH	Kaliumhydroxid
kPa	Kilopascal
l	Liter
Ler	Ökotyp Landsberg <i>erecta</i> (<i>Arabidopsis thaliana</i>)
LSC	große Einzelkopie-Region des Plastoms (<i>large single copy region</i>)
m	Meter
M	Mol (mol/l)
MEN	MOPS-EDTA-NaAc-Puffer
MeOH	Methanol
MES	2-[N-Morpholino]ethansulfonsäure
MgAc ₂	Magnesiumacetat
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute(n)
min.	mindestens
MOPS	3-[N-Morpholino]-propansäure
Mrd.	Milliarde
mRNA	messenger RNA (Boten-RNA)
<i>N.t.</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>
Na	Natrium
Na ₂ [HPO ₄]	Di-Natriumhydrogenphosphat
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NASC	Nottingham <i>Arabidopsis</i> Stock Center
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NEP	nukleär kodierte plastidäre RNA-Polymerase(n)
NF	Norflurazon
nt	Nukleotide
o.	oben
ORF	offener Leserahmen (<i>open reading frame</i>)
P	Phosphat
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Anhang

PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PEP	plastidär kodierte plastidäre RNA-Polymerase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPR	Pentatricopeptid <i>repeat</i>
PS	Photosystem
psi	<i>pound per square inch</i>
RbcL	große Untereinheit der RuBisCO
RIP-Chip	RNA-Immunopräzipitation und Chip-Hybridisierung
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
rRNA	ribosomale RNA
rrT	radioaktive reverse Transkription
rT	reverse Transkription
RT	Raumtemperatur/reverse Transkriptase
RuBisCO	Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/-Oxygenase
s	Sekunde(n)
s.	siehe
S.	Seite
<i>S.o.</i>	<i>Spinacia oleracea</i>
SAIL	Syngenta <i>Arabidopsis</i> Insertion Library
SDS	Natriumdodecylsulfat
SIGnAL	Salk Institute Genomic Analysis Laboratory
Spec.	Spectinomycin-Dihydrochlorid-Pentahydrat
SSC	Natriumchlorid-Natriumcitrat-Puffer
SSC	kleine Einzelkopie-Region des Plastoms (<i>small single copy region</i>)
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBST	Tris-gepufferte Saline Tween 20
T-DNA	Transfer-DNA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-[Hydroxymethyl]-aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
UE	Untereinheit
ÜN	über Nacht
UTP	Uridintriphosphat
UTR	untranslatierte Region
UV	ultraviolett
V	Volt
Vol.	Volumen
Vol.-%	Volumenprozent
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indoxyl- β -D-Galactopyranosid
z.B.	zum Beispiel
<i>Z.m.</i>	<i>Zea mays</i>
z.T.	zum Teil

Danksagung

Die ersten Dankesworte gebühren meiner Familie, die mich über all die Jahre unterstützt und gefördert hat. Danke **Melanie**, danke **Lale** für euer Verständnis. Meinen **Eltern**, „**Schwiegereltern**“ und **Freunden** sei für die langjährige Ausdauer und Geduld im Umgang mit fortwährendem Zeitmangel gedankt.

Meinem Chef **Prof. Dr. Christian Schmitz-Linneweber** danke ich für die interessante Aufgabe, die ausgezeichnete und konstruktive Betreuung und vor allem für die familienfreundliche Atmosphäre in unserer Arbeitsgruppe. **Susanne**, trotz anfänglicher Dispute sind wir am Ende doch noch fast so etwas wie ein altes „Doktorandenehepaar“ geworden. Alles Gute für deine Zukunft. **Michi** (Dr. Tillich) sei für die schier endlose Flut an Ideen gedankt. Es war mehr als eine Freude, mit dir zusammenarbeiten zu dürfen (wenn man mal von der Laborordnung absieht). **Reik**, alter „Strominator“, dir danke ich für die kompetente Unterstützung in allen Labordingen und wünsche dir viel Glück in der neuen alten Heimat. **Christiane**, **Sabrina**, **Simone**, **Janne**, **Erik** und all den anderen Labor-4-Leuten: Vielen Dank für die Unterstützung und die tolle Zeit.

Prof. Dr. Alice Barkan und ihrem Team danke ich für die angenehme und fruchtbare Zeit in ihrem Labor an der Universität von Oregon. **Jeannette** (Dr. Pfalz) sei insbesondere für die Aufrechterhaltung der deutschen Sprachkultur gedankt.

Ein Hoch auf die deutsch-israelische Freundschaft. Danke **Oren** (Dr. Ostersetzer-Biran) für die Diskussionen über Maturasen und die Zusammenarbeit beim ISE-Paper.

Karsten (Dr. Liere), der immer ein offenes Ohr für die Probleme eines Doktoranden hatte, sei besonders für die Korrekturen und Anmerkungen zu dieser Arbeit gedankt.

Prof. Dr. Thomas Börner danke ich für die langjährige Unterstützung.

Dr. Mark Aurel Schöttler und **Dr. Waltraud Schulze** vom MPI in Golm danke ich für die Ausführung von Fluoreszenzmessungen und Massenspektrometrie.

Für die Bereitstellung verschiedener Vektoren zur Untersuchung der MatK-Expressionsregulation danke ich **Prof. Dr. Alan Lambowitz**.

Dr. Oliwia Makarewicz möchte ich für die Einführung in den Miller-*Assay* danken. Der ganzen **dritten Etage** sei für die angenehme Arbeitsatmosphäre gedankt.

Prof. Dr. Wolfgang Hess und **Dr. Boris Hedtke** möchte ich für die Grundausbildung in naturwissenschaftlichem Arbeiten und Denken zu Beginn meiner „Karriere“ danken.

Lebenslauf

Publikationen:

- 2007 **Zoschke, R.;** Liere, K. und Börner, T.: From seedling to mature plant: *Arabidopsis* plastidial genome copy number, RNA accumulation and transcription are differentially regulated during leaf development, *Plant J* 50 [4], Seite 710-722.
- 2009 **Zoschke, R.;** Ostersetzer, O.; Börner, T. und Schmitz-Linneweber, C.: Analysis of the regulation of MatK gene expression, *Endocytobiosis Cell Res* 19, Seite 127-135.
- 2010 **Zoschke, R.;** Nakamura, M.; Liere, K.; Sugiura, M.; Börner, T. und Schmitz-Linneweber, C.: An organellar maturase associates with multiple group II introns, *Proc Natl Acad Sci U S A* 107 [7], Seite 3245-3250.
- eingereicht **Zoschke, R.*;** Kupsch, C.* und Schmitz-Linneweber, C.: RNA binding proteins required for chloroplast RNA processing, Buchkapitel in *Plant Mitochondria*, Frank Kempken (Editor), Springer Verlag, New York. [* geteilte Erstautorschaft]
- eingereicht Preuten, T.; Cincu, E.; Fuchs, J.; **Zoschke, R.;** Liere, K. und Börner, T.: Low and variable gene copy numbers in plant mitochondria, *Plant J*

Beiträge zu wissenschaftlichen Tagungen:

- 2006 Vortrag auf dem „XVII. Havel-Spree-Kolloquium“ (Potsdam), Thema: „From cotyledon to mature plant: *Arabidopsis* plastidial genome copy number, RNA accumulation and transcription“
- 2007 Posterpräsentation auf der „20. Tagung Molekularbiologie der Pflanzen“ (Dabringhausen), Thema: „From seedling to mature plant: analyses of *Arabidopsis* plastidial genome copy number, RNA accumulation and transcription during leaf development“
- 2008 Posterpräsentationen auf dem „Mitochondria & Chloroplasts Gordon-Kenan Research Seminar“ und der „Mitochondria & Chloroplasts Gordon Research Conference“ (Biddeford, ME, USA), Thema: „Analysis of the plastidial splice factor MatK“

- 2009 Vortrag auf der „22. Tagung Molekularbiologie der Pflanzen“ (Dabringhausen), Thema: „MatK: Ein plastidär kodiertes RNA-Bindeprotein interagiert mit multiplen Introns *in vivo*“
- 2009 Posterpräsentationen auf dem „Leopoldina-Symposium: Molecular Genetics of Chloroplasts and Mitochondria“ und dem „XIII. Annual Meeting of the German Section of the International Society for Endocytobiology“ (Berlin), Thema: „An Organellar Maturase Associates with Multiple Group II Introns“

Beitrag zur Lehre:

- 2009 Betreuung einer Bachelorarbeit

Stipendium:

- 2007 Deutscher Akademischer Austausch Dienst: Kurzzeitstipendium für Doktoranden (Finanzierung eines Forschungsaufenthalts in den USA)

Forschungsschwerpunkte:

- Posttranskriptionelle Prozesse in Plastiden, Schwerpunkt Spleißen
- PPR-Proteine und ihre Rolle im plastidären Nukleinsäuremetabolismus
- Plastidäre und mitochondriale Genomkopienzahlen im Kontext der organellären Genexpression

Berlin, den 01.03.2010

.....
[Reimo Zoschke]

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, gemäß §6 der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt-Universität zu Berlin (02/2005), die vorliegende Dissertation eigenständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben. Diese Arbeit wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt. Ich habe mich weder anderwärts um einen Doktorgrad beworben, noch besitze ich einen entsprechenden Doktorgrad. Die dem Verfahren zugrunde liegende Promotionsordnung ist mir bekannt.

Berlin, den 01.03.2010

.....
[Reimo Zoschke]