

Charakterisierung der chloroplastidären RNA-Bindeproteine CP33A und CP33B in *Arabidopsis thaliana*

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades
doct o r r e r u m n a t u r a l i u m
(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie
eingereicht an der Lebenswissenschaftlichen Fakultät
der Humboldt-Universität zu Berlin
von

Diplom-Biologin Marlene Teubner

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin:
Prof. Dr.-Ing. Dr. Sabine Kunst

Dekan der Lebenswissenschaftlichen Fakultät:
Prof. Dr. Bernhard Grimm

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. Christian Schmitz-Linneweber
2. Prof. Dr. Kerstin Kaufmann
3. Prof. Dr. Kirsten Krause

Tag der mündlichen Prüfung: 18.12.2018

Zusammenfassung

Plastiden enthalten ihr eigenes Genom, das unter anderem für essentielle Untereinheiten des photosynthetischen Apparates kodiert. Die Expression dieses Apparates wird hauptsächlich posttranskriptionell reguliert. Dafür notwendige Faktoren sind vor allem RNA-Bindeproteine (RBPs), welche fast ausschließlich kernkodiert und posttranslational in die Plastiden importiert werden. Zu diesen Kernfaktoren gehören auch die äußerst abundanten chloroplastidären Ribonukleoproteine (cpRNPs). Die bisher näher untersuchten Mitglieder der cpRNP-Familie aus *Arabidopsis thaliana* sind an der Prozessierung und Stabilisierung von chloroplastidären Transkripten beteiligt und phylogenetisch eng miteinander verwandt. In dieser Studie wurden zwei noch unbekannte Mitglieder der cpRNP Familie, die nicht derselben phylogenetischen Gruppe angehören, CP33A und CP33B, näher untersucht.

Bei CP33A handelt es sich um ein essentielles Protein der Chloroplastenbiogenese. Mutanten von CP33A keimen nur in der Gegenwart einer externen Kohlenstoffquelle. Die Blätter sind albinotisch, in ihrer Struktur anomal und das gesamte Wachstum ist stark eingeschränkt. Untersuchungen der RNA-Interaktionspartner von CP33A durch RIP-Chip-Analysen (RNA-Immunoprecipitation und Chip-Hybridisierung) zeigen, dass CP33A mit allen mRNAs assoziiert. Dabei koprecipitiert mehr als 50% der im Stroma befindlichen *rbcL* und *psbF* mRNAs mit CP33A. Des Weiteren führt der Verlust von CP33A zu einer starken Reduktion vieler Transkripte, vor allem RNAs, die durch die plastidär kodierte RNA Polymerase (PEP) transkribiert werden. Abgesehen davon kommt es in *cp33a*-Nullmutanten zu einer Destabilisierung unprozessierter und ungespleißter Vorläufer-Transkripte.

CP33B interagiert ähnlich wie CP33A mit multiplen chloroplastidären RNAs. Dabei zeigt CP33B eine Präferenz für *psbA*, indem 90% der im Stroma befindlichen *psbA* mRNA mit CP33B assoziiert. Feinkartierung der CP33B-Bindung innerhalb des *psbA* Leserahmens verdeutlicht, dass CP33B vor allem mit dem 3'Ende des Transkriptes interagiert. Phänotypische und genetische Untersuchungen der *cp33b*-Nullmutante ließen keinen vom Wildtyp abweichenden Phänotyp identifizieren und zeigten dass CP33B keinen essentiellen Einfluss auf die Proteinakkumulation photosynthetischer Untereinheiten, die Expression chloroplastidärer Transkripte, das Spleißen und die Edierung seiner Ziel-RNAs hat.

CP33A und CP33B sind weder mit Polysomen noch mit rRNAs assoziiert. Daher könnten beide Proteine Teil einer noch unbeschriebenen topologischen Domäne innerhalb des

Zusammenfassung

Chloroplasten sein, welche mit untranslatierten plastidären mRNAs angereichert ist und hier als sogenannte „Ribodomäne“ bezeichnet wird. Eigene und frühere Analysen legen nahe, dass diese Ribodomäne unabhängig von der chloroplastidären Translations-Maschinerie ist.

Schlagerworte: Chloroplast, cpRNPs, RIP-Chip, RNA-Bindung, RNA-Prozessierung, RNA-Stabilität

Abstract

Plastids harbour their own genome, which encodes for essential subunits of the photosynthetic apparatus. The expression of these subunits is mainly regulated on the posttranscriptional level. The important factors for posttranscriptional processing are RNA-binding proteins (RBPs), which are almost exclusively nuclear-encoded and imported posttranslational into the plastids. Among them are the chloroplast ribonucleoproteins (cpRNPs). The cpRNPs are a family of highly abundant RNA-binding proteins found in the chloroplast of land plants. Members of the *Arabidopsis thaliana* cpRNP family, that have been investigated in more detail, are involved in processing and stabilization of plastid transcripts and are phylogenetically closely related. In this study two unknown members of the cpRNPs, CP33A and CP33B, which cluster outside of this phylogenetic group, are investigated in more detail. CP33A is essential for chloroplast biogenesis. Null alleles of CP33A only germinate in the presence of an external carbon source. *cp33a* seedlings are albino, show strong growth inhibition and an abnormal leaf structure. Investigating RNA-ligands of CP33A using RIP-Chip (*coimmunoprecipitation coupled to microarray analysis*) shows an association with all chloroplast mRNAs. More than 50% of the stromal *rbcL* and *psbF* mRNAs co-precipitate with CP33A. The loss of CP33A leads to a reduction of almost all transcripts, predominantly affecting RNAs transcribed by the plastid-encoded RNA polymerase (PEP). In addition unspliced and unprocessed precursor mRNAs are much more strongly reduced in *cp33a*-mutants relative to albino controls.

Similar to CP33A, CP33B interacts with multiple plastid RNAs. The main target is the mRNA of *psbA*. More than 90% of the stromal *psbA* mRNA is associated with CP33B. Fine mapping efforts suggest that CP33B preferentially interacts with the 3'-end of the *psbA* reading frame. Phenotypic and genetic analyses of the *cp33b*-null mutant do not show any differences compared to wild-type plants. CP33B has no essential impact on: Protein accumulation of photosynthetic subunits, expression of plastid transcripts, RNA-splicing or RNA-editing of its target RNAs.

CP33A and CP33B both fail to associate with polysomes or ribosomal RNAs. Possibly they define a topological domain inside the chloroplast, which is enriched in untranslated plastid mRNAs and is herein named “ribodomain”. This ribodomain seems to be independent of the plastid translational machinery, as shown earlier and within this study.

Keywords: chloroplast, cpRNPs, RIP-Chip, RNA binding, RNA processing, RNA stability

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Abstract	III
Inhaltsverzeichnis	IV
1. Einleitung	1
1.1 Chloroplasten und ihr endosymbiontischer Ursprung.....	1
1.2 Das plastidäre Genom (Plastom)	1
1.3 Genexpression im Chloroplasten.....	3
1.3.1 Transkription.....	3
1.3.2 Posttranskriptionelle Prozesse	4
1.3.3 Translation	7
1.4 RNA-Bindeproteine.....	8
1.4.1 Plastidäre Proteine mit RRM-Domänen	9
1.5 Zielstellung	14
2. Material und Methoden	15
2.1 Material.....	15
2.1.1 Chemikalien und molekularbiologische Reagenzien.....	15
2.1.2 Geräte und Anbieter.....	15
2.1.3 Pflanzenmaterial	15
2.1.4 Antikörper und Oligonukleotide.....	16
2.2 Methoden.....	16
2.2.1 Pflanzenanzucht.....	16
2.2.2 Samensterilisation.....	17
2.2.3 Antikörper-Produktion.....	17
2.2.4 DNA-Extraktion	18
2.2.5 RNA-Extraktion.....	18
2.2.6 Überprüfung der RNA/DNA Qualität und Quantität.....	18
2.2.7 Genotypisierung.....	19
2.2.8 Polymerase-Kettenreaktion.....	19
2.2.9 Agarosegelelektrophorese.....	20
2.2.10 Northern Blot	20
2.2.11 <i>Dot-Blot</i> -Analysen.....	22
2.2.12 Markierung von RNA-, Oligonukleotid- und PCR-Sonden	22
2.2.13 Hybridisierung und Detektion von radioaktiven Sonden	23
2.2.14 Quantitative Real-Time-PCR.....	24

2.2.15	Edierungsanalysen	24
2.2.16	Isolation und Fraktionierung von Chloroplasten	25
2.2.17	Ko-Immunopräzipitationen.....	26
2.2.18	RIP-Chip-Analysen.....	27
2.2.19	<i>In-vitro</i> RNA-Bindestudien	29
2.2.20	Proteinisolation und Quantifizierung.....	30
2.2.21	Western-Analysen.....	30
2.2.22	Polysomenanalyse.....	31
2.2.23	Lokalisationsstudien mittels Fluoreszenzmikroskopie	32
3.	Ergebnisse.....	34
3.1	CP33A und CP33B lokalisieren hauptsächlich im Stroma	34
3.1.1	CP33A und CP33B kolokalisieren nicht mit Nukleoiden	36
3.2	CP33A und CP33B interagieren mit multiplen plastidären RNAs	38
3.2.1	Ko-Immunopräzipitationen mit spezifischen Antikörpern.....	38
3.2.2	CP33A interagiert mit der Mehrheit der plastidären mRNAs	39
3.2.3	CP33B interagiert mit vielen plastidären RNAs, präferenziell mit <i>psbA</i>	40
3.3	CP33A und CP33B assoziieren nicht mit Polysomen, aber mit hochmolekularen Komplexen	42
3.4	Analyse der <i>cp33a</i> -Nullmutanten.....	44
3.4.1	Die Depletion von CP33A führt zu einem drastischen Phänotyp.....	44
3.4.2	Globaler Verlust von plastidären Proteinen in <i>cp33a</i> -Nullmutanten	46
3.4.3	Untersuchung plastidärer Transkripte in <i>cp33a</i> -Nullmutanten	48
3.5	CP33A interagiert mit freien RNAs	56
3.6	Analyse der <i>cp33b</i> -Nullmutanten.....	58
3.6.1	Der Knockout von CP33B führt zu keinen makroskopischen Defekten	58
3.6.2	Kein veränderter Phänotyp der <i>cp33b</i> -Mutanten unter Licht- und Kälte-Stress.....	59
3.6.3	In <i>cp33b</i> -Nullmutanten sind die Proteinmengen einiger photosynthetischer Proteine leicht reduziert.....	61
3.6.4	Plastidäre Transkriptmengen sind in <i>cp33b</i> -Nullmutanten nur unwesentlich verändert	63
3.6.5	CP33B ist kein essentieller Spleiß- oder Edierungsfaktor.....	66
3.6.6	CP33B hat keinen essentiellen Einfluss auf die Translationseffizienz von <i>psbA</i>	68
3.6.7	CP33B ist nicht essentiell für die Lokalisation der <i>psbA</i> mRNA.....	69
3.7	RNA-Bindestudien mit CP33B	72
3.7.1	CP33B interagiert mit <i>psbA</i> an multiplen Bindestellen.....	72
3.7.2	<i>In vitro</i> Bindestudien mit rekombinanten CP33B	76

4. Diskussion	80
4.1 CP33A ist essentiell für Chloroplasten und die pflanzliche Entwicklung	80
4.1.1 Wird der <i>cp33a</i> -Phänotyp durch einen primären Defekt oder multiple Defekte verursacht?	81
4.1.2 Indizien und Ursachen einer globalen Verminderung der Translation in den <i>cp33a</i> -Mutanten	83
4.1.3 Der Verlust von CP33A führt zu einer verminderten PEP-Aktivität	85
4.2 CP33B ist unter Standardbedingungen nicht essentiell für die pflanzliche Entwicklung.....	87
4.3 CP33A und CP33B sind globale RNA-Bindeproteine.....	89
4.3.1 Neben einer globalen mRNA-Bindefähigkeit besitzen CP33A und CP33B Sequenzpräferenzen	90
4.3.2 cpRNPs interagieren mit ihren Ziel-Transkripten über multiple Bindestellen	92
4.4 Werden lange Transkripte von cpRNPs bevorzugt?	93
4.5 cpRNPs als RNA-Stabilisatoren von Vorläufer-Transkripten	94
4.6 Ribodomänen – hochmolekulare Komplexe definiert durch cpRNPs?.....	97
4.6.1 Ribodomänen und ihre Funktion im Schutz von Polysomen dissoziierten mRNAs	98
4.7 Modell der Funktionsweise von CP33A.....	100
Literaturverzeichnis	102
Anhang	117
Abkürzungen	164
Danksagung	166
Publikationen	167
Selbstständigkeitserklärung	168

1. Einleitung

1.1 Chloroplasten und ihr endosymbiontischer Ursprung

Pflanzen vollführen als photoautotrophe Eukaryoten einen der wichtigsten Prozesse auf der Erde – die Photosynthese. Ort der Photosynthese und der damit verbundenen Biosynthese von Kohlenhydraten sind die Chloroplasten. Neben den Chloroplasten besitzen Pflanzen noch weitere Plastidentypen, welche sich allesamt aus den Proplastiden entwickeln können (Waters und Pyke 2004).

Eine typische Pflanzenzelle besitzt drei genetische Systeme: Im Zellkern, in den Plastiden und in den Mitochondrien. Laut der Endosymbiontentheorie stammen Plastiden und Mitochondrien von zuvor eigenständigen, freilebenden, prokaryotischen Lebewesen ab (Mereschkowsky 1905, Margulis 1970). Hierbei nahm vor etwa 1,5 bis 2 Milliarden Jahren eine ursprüngliche Wirtszelle, archaebakteriellen Ursprungs zunächst ein aerobes α -Proteobakterium über Endozytose auf und ging mit diesem eine Endosymbiose ein. Im Laufe der Zeit verlor der Endosymbiont seine Eigenständigkeit und entwickelte sich zum heutigen Mitochondrium. Auf ähnliche Weise entwickelten sich die Plastiden, indem eine mit Mitochondrien ausgestattete Wirtszelle ein freilebendes photosynthetisches Cyanobakterium integrierte (zusammengefasst in Gray 1999, Kutschera und Niklas 2004, Zimorski et al. 2014).

1.2 Das plastidäre Genom (Plastom)

Im Laufe der Evolution kam es zu einer drastischen Verkleinerung des Plastidengenoms (Plastom). So besitzen Chloroplasten nur noch 5-10% ihres ursprünglich bakteriellen Genoms (Martin et al. 2002). Dies ist zurückzuführen auf: Gensubstitutionen, multiple Gentransferereignisse in den Zellkern und den kompletten Verlust plastidärer Gene (Martin und Herrmann 1998). Der Gentransfer ist bei Pflanzen kein abgeschlossener, sondern ein noch fortwährender Prozess (Timmis et al. 2004). Die nun im Zellkern kodierten und im Cytoplasma synthetisierten Genprodukte gelangen über N-terminale Transitsequenzen zurück in die Organellen (zusammengefasst in Leister 2003). Dabei werden ca. 2000-3000 kernkodierte Genprodukte in die Plastiden höherer Pflanzen importiert (Friso et al. 2004, Ferro et al. 2010). Der Photosyntheseapparat wird somit aus kern- und plastidenkodierten Komponenten aufgebaut, wodurch eine Koordination zwischen der Proteinsynthese im

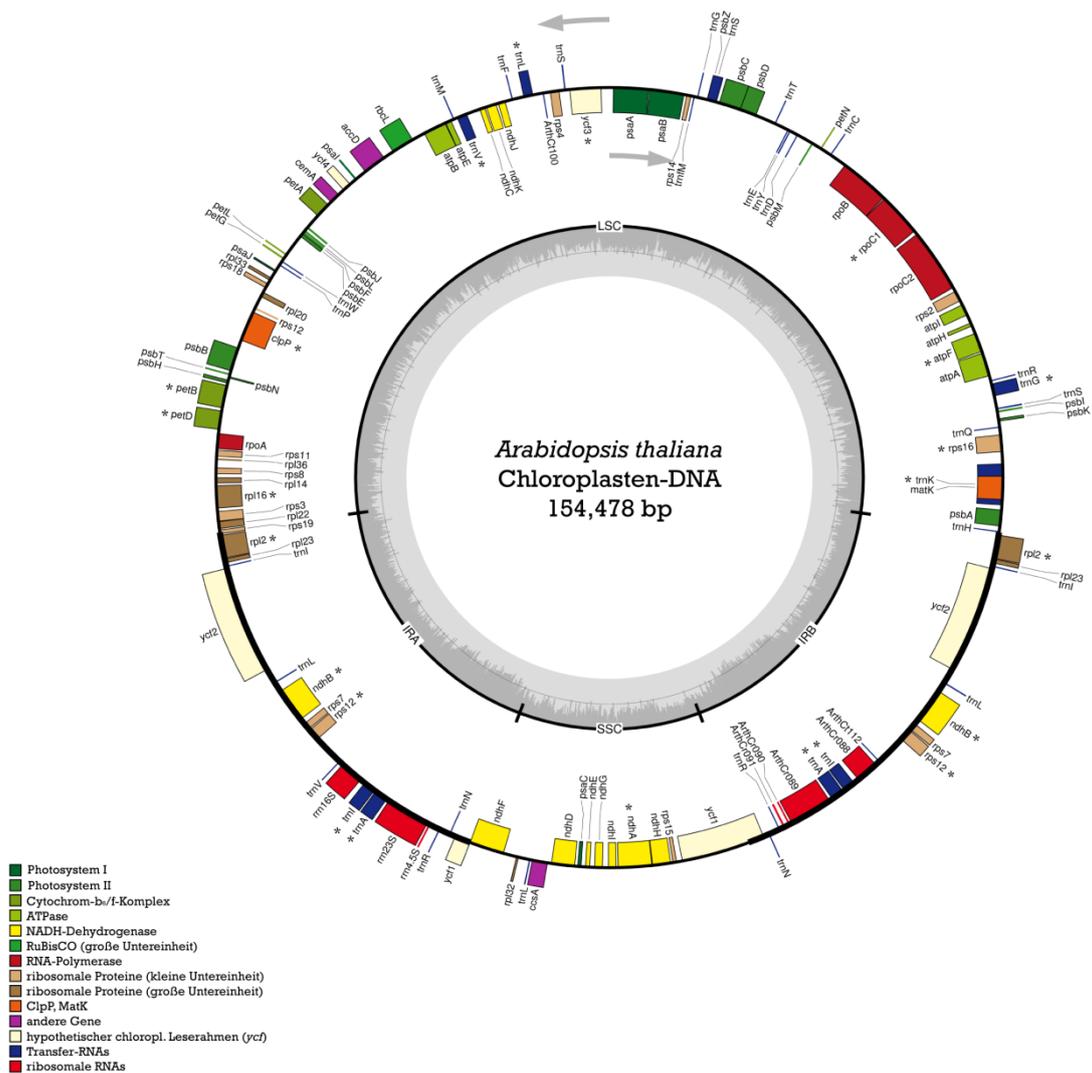


Abb. 1: Genkarte des Plastoms von *Arabidopsis thaliana*

Die Gene und offenen Leserahmen sind durch unterschiedliche Farben, entsprechend ihrer biologischen Funktion, gekennzeichnet. Der innere Kreis stellt den GC-Gehalt des Plastoms dar. Die zwei grauen Pfeile zeigen die Richtung der Transkription an. SSC: *small single copy* (kleine Einzelregion), LSC: *large single copy* (große Einzelregion), IRA und IRB: invertierte repetitive Bereiche A und B. Gene mit Introns sind durch einen Stern markiert. Die Grafik wurde mit Hilfe von OGDRAW und der NCBI *accession number* NC_000932 erstellt (Lohse et al. 2013).

Cytosol und in den Plastiden für die Biogenese der Chloroplasten zwingend erforderlich ist (Tiller und Bock 2014).

Das plastidäre Genom höherer Pflanzen ist im Durchschnitt 120-160 kb groß und kodiert für etwa 60-200 Gene. Das 154 kb große Plastom der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana*, welche in dieser Arbeit verwendet wurde, enthält Gene für vier rRNAs, 37 tRNAs sowie 87 proteinkodierende Gene (Abb. 1). Letztere kodieren für Untereinheiten des Photosyntheseapparates, für die Genexpression, wie Komponenten des Transkriptions- und Translationsapparates und zusätzlich für vereinzelte Genprodukte der Fettsäuresynthese, dem Proteinimport und der Proteolyse (Maier und Schmitz-Linneweber 2004). Mehrere Kopien

der plastidären DNA liegen pro Organell in Nukleoiden, hauptsächlich als zirkuläres, doppelsträngiges und superhelikales DNA-Molekül organisiert, vor (zusammengefasst in Powikrowska et al. 2014). Das Plastom lässt sich in vier charakteristische Bereiche unterteilen: Die große und die kleine Einzelkopieregionen (LSC: *large single copy region*; SSC: *small single copy region*) werden durch zwei invertierte repetitive Bereiche IRA und IRB (IR: *inverted repeat*) separiert, in denen die ribosomalen Operons liegen (Abb. 1).

1.3 Genexpression im Chloroplasten

Die plastidäre Genexpression weist sowohl prokaryotische als auch eukaryotische Charakteristika auf. So sind Gene mit verwandten Funktionen in Operons organisiert und werden wie in Prokaryoten als polycistronische RNAs transkribiert. Anschließend werden die Vorläufer-RNAs durch verschiedene posttranskriptionelle Modifikationen, ähnlich den nukleär/cytosolischen prä-RNAs, prozessiert. An diesen Prozessen sind hauptsächlich kernkodierte Proteine eukaryotischen Ursprungs beteiligt (zusammengefasst in Barkan 2011). In den folgenden Abschnitten werden die einzelnen Schritte der plastidären Genexpression von der Transkription bis zur Translation kurz näher erläutert.

1.3.1 Transkription

Die Gene des Chloroplasten werden durch RNA-Polymerasen mit unterschiedlicher phylogenetischer Herkunft abgelesen: eine plastidär kodierte plastidäre RNA-Polymerase des Bakterientyps (PEP, *plastid-encoded plastid RNA polymerase*) und eine (oder zwei) kernkodierte plastidäre RNA-Polymerase des T3/T7-Phagentyps (NEP, *nuclear-encoded plastid RNA polymerase*) (Allison 1996, Hajdukiewicz et al., 1997). Die PEP setzt sich aus fünf Untereinheiten (2 x α , β , β' und β'') zusammen, welche durch die plastidären Gene *rpoA*, *rpoB*, *rpoC1* und *rpoC2* kodiert werden und das katalytische Enzym bilden (zusammengefasst in Börner et al. 2015). Zusammen mit einem von 6 kernkodierten Sigmafaktoren, welche die spezifische Promotorerkennung und damit die Transkriptionsinitiation ermöglichen, wird das Holoenzym gebildet. Es gibt Hinweise, dass die Sigmafaktoren eine regulatorische Funktion in der plastidären Genexpression übernehmen (Chi et al. 2015, Lerbs-Mache 2011).

Die NEPs sind RNA-Polymerasen, die aus einem einzigen Polypeptid aufgebaut sind und wegen ihrer Homologie zu den RNA-Polymerasen der Bakteriophagen T3, T7 und SP6 auch als Phagentyp-RNA-Polymerasen bezeichnet werden. Das Kerngenom der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* enthält drei Gene der kleinen Familie der Phagentyp-RNA-Polymerasen.

In vitro- und *in vivo*-Importstudien zeigen, dass eines der Enzyme nach der Translation in die Mitochondrien gelangt (RpoTm), eines in die Plastiden (RpoTp) und die dritte Polymerase, mit dualem Transitpeptid (RpoTmp), sowohl in Mitochondrien als auch in Plastiden importiert wird (zusammengefasst in Liere et al. 2011). Die NEP transkribiert vorzugsweise Haushaltsgene, wie ribosomale Proteine und Gene der PEP, wogegen PEP hauptsächlich für die Synthese von Photosynthesegenen zuständig ist (Hajdukiewicz et al. 1997). Diese Arbeitstrennung ist jedoch nicht absolut, so besitzen die meisten plastidären Gene sowohl Promotoren für die PEP als auch für die NEP (Zhelyazkova et al. 2012, zusammengefasst in Börner et al. 2015). Beide Polymerasen sind für die Entwicklung des Photosyntheseapparates essentiell (Allison et al. 1996, Hricova et al. 2006).

Nach der Transkription werden die in polycistronischer Form vorkommenden mRNAs durch verschiedenste posttranskriptionelle Modifikationen verändert (s. Kap. 1.3.2). Es wird angenommen, dass die Genexpression weniger auf der Ebene der Transkription, sondern eher durch posttranskriptionelle Prozesse und auf der Ebene der Translation reguliert wird. So korrelieren Transkriptionsraten und Transkriptmengen nicht miteinander (Deng und Gruissem 1987).

1.3.2 Posttranskriptionelle Prozesse

1.3.2.1 Stabilisierung, Intercistronische und End-Prozessierung

Durch eine ineffiziente Termination der plastidären Transkription, welche im Vergleich zur Transkription im Zellkern nicht an einem bestimmten Punkt endet (Stern und Gruissem 1987), kommt es in den Chloroplasten zu einer Anreicherung von großen Transkriptabschnitten und zahlreichen nicht-funktionellen RNAs (Shi et al. 2016). Ribonukleasen sorgen für den rapiden Verdau der nicht-funktionellen RNAs, sowie für die intercistronische Prozessierung der langen Transkripte, wobei gleichzeitig 3' und 5' Enden generiert werden (zusammengefasst in Germain et al. 2013). Genauer entstehen die reifen 5' und 3' Enden indem das Fortschreiten von Exonukleasen, entweder durch RNA-Stamm Schleifenstrukturen oder durch die Bindung von RNA-Bindeproteinen (RBP), in den 3' und 5' untranslatierten Regionen (UTRs), blockiert wird (Pfalz et al. 2009, Prikryl et al. 2011).

Nach einem ähnlichen Prinzip verläuft die intercistronische Prozessierung. Früher wurde angenommen, dass mono- bzw. oligocistronische mRNAs durch einen einzelnen Endonuklease-Schnitt innerhalb einer polycistronischen RNA entstehen. Jedoch wurden in

mehreren polycistronischen Transkripten eine Überlappung der 3' und 5' Enden von benachbarten RNAs festgestellt (Bsp. *atpH-atpI* Pfalz et al. 2009). In einem Modell, basierend auf einer Pilotstudie zu PPR10, wird die mRNA zunächst durch eine Endonuklease unspezifisch geschnitten und anschließend durch Exoribonukleasen verdaut, bis eine Stammschleife oder ein RBP den Fortgang blockieren (zusammengefasst Barkan 2011). Mittlerweile konnten mehrere Studien dieses Modell stützen (zusammengefasst Manavski 2018). Damit wird die Prozessierung von polycistronischen Transkripten und die End-Prozessierung vielmehr durch gezielte Stabilisierungen von Transkript-Enden als durch spezifische Angriffe von Ribonukleasen bestimmt. Im Chloroplast sind derzeit drei Exonukleasen und sechs Endonukleasen bekannt, welche allesamt kernkodiert sind (Germain et al. 2013). Die Halbwertszeit der plastidären RNAs ist im Vergleich zu Bakterien um ein Vielfaches größer (Germain et al. 2012). Vermutlich sind vor allem RNA-Bindeproteine entscheidend für die Stabilität plastidärer RNAs. Dazu zählen Proteinfamilien, welche in Prokaryoten nicht vorhanden sind, wie die Mitglieder der PPR- (Barkan und Small 2014) und der cpRNP-Familie (s. Kap. 1.4.1.11, Nakamura et al. 2001, Kupsch et al. 2012).

1.3.2.2 Spleißen

Die plastidären Gene höherer Pflanzen besitzen ungefähr 20 Introns. Dabei sind ~19 Introns aufgrund von konservierten Strukturelementen und ihrem Spleißmechanismus der Gruppe II und nur das Intron in *trnL*-UAA der Gruppe I zuzuordnen (zusammengefasst in de Longevialle et al. 2010). Die plastidären Introns können sich nicht wie in Bakterien autokatalytisch selber spleißen und benötigen für ihr Herausschneiden die Unterstützung von Spleißfaktoren (Barkan 2011). Die Spleißfaktoren sind bis auf eine Ausnahme (MatK) kernkodiert, stammen von der ursprünglichen Wirtszelle und haben damit einen evolutionär jungen Ursprung (Germain et al. 2013). Abhängig vom Intron wird der Spleißprozess im Chloroplast durch eine Kombination von verschiedenen Spleißfaktoren unterstützt (Übersicht in Germain et al. 2013, de Longevialle et al. 2010). Die Spleißfaktoren besitzen eher untypische RNA-Bindemotive, welche hauptsächlich/ausschließlich in Organellen gefunden werden, wie z.B. CRM, PORR, APO, PPR und OPR Motive (Germain et al. 2013). Neben den kernkodierten Spleißfaktoren existiert mit der Maturase K (MatK) ein plastidärer Spleißfaktor, der im Intron von *trnK* kodiert ist. MatK weist Ähnlichkeiten zu bakteriellen Maturasen auf und interagiert mit mehreren Gruppe-IIA-Introns (Zoschke et al. 2010).

Die Spleißeffizienz in Plastiden variiert abhängig von Umwelt und Entwicklung (Deshpande et al. 1997, Barkan 1989). Aus diesem Grund wird über einen potentiellen regulativen Einfluss des Spleißens auf die plastidäre Genexpression diskutiert (Schmitz-Linneweber und Barkan 2007).

1.3.2.3 Edierung

Typisch für die plastidäre Genexpression der Landpflanzen ist die RNA-Edierung, bei der vor allem Cytosine (C) zu Uracilen (U) desaminiert werden. In einigen Vertretern der Farne, Moose und Bärlappgewächse (Lycopodiaceae) finden zusätzlich auch U zu C Umwandlungen statt (Übersicht in Ichinose und Sugita 2016). Die Anzahl der Edierungsstellen kann von 0 bis über 3000 stark variieren. Im Plastom von *Arabidopsis thaliana* sind derzeit 43 Edierungsstellen bekannt (Ruwe et al. 2013).

Der Hauptteil der RNA-Edierungen findet in kodierenden Regionen statt, wodurch die Sequenz konservierter Codons aufrechterhalten wird. Es gibt Hinweise darauf, dass einzelne Edierungsereignisse die Translation in Chloroplasten regulieren können. Zusätzlich variiert die Edierungseffizienz in verschiedenen Geweben und Entwicklungsstadien. Der Beweis für einen regulativen Einfluss der RNA-Edierung auf die plastidäre Gen Expression fehlt allerdings noch (zusammengefasst in Ichinose und Sugita 2016).

Eine hohe Anzahl an kernkodierte Transfaktoren ist für die Edierung essentiell. Dazu gehören unter anderem zahlreiche Mitglieder der PPR-Familie, welche an der Erkennung von variablen Cis-Elementen, die stromaufwärts der Edierungsstellen liegen, beteiligt sind (Takenaka et al. 2013, Barkan et al. 2012). Alle an der Edierung beteiligten PPR-Proteine gehören zur PLS-Klasse, welche sich durch eine C-terminale E-Domäne auszeichnen (zusammengefasst in Ichinose und Sugita 2016, Shikanai 2015)

Die E-Domäne ist essentiell für die Edierung und ist möglicherweise für die Protein-Protein Interaktionen zuständig (Okuda et al. 2007, Wagoner et al. 2015, zusammengefasst in Takenaka 2014). Zusätzlich trägt die Hälfte der PLS-Klasse PPR-Proteine eine DYW-Domäne. Die DYW-Domäne ist eventuell für die Desaminierung der Cytosine zuständig, ein Beweis *in vivo* fehlt allerdings noch (Salone et al. 2007, Rüdinger et al. 2012, Boussardon et al. 2014). Da nicht alle an der Edierung beteiligten PPR-Proteine eine DYW-Domäne besitzen, muss eine Desaminase-Aktivität auch außerhalb von PPR-Proteinen existieren und wird vermutlich extra rekrutiert (Boussardon et al. 2012, Guillaumot et al. 2017).

Neben den PPR-Proteinen sind noch weitere Transfaktoren essentiell für die Edierung, darunter zählen insbesondere Mitglieder von drei kleineren Proteinfamilien: den MORFs (*multiple organellar RNA-editing factor family*) bzw. auch RIPs (*RNA-editing factor interacting proteins*) genannt, ORRM (*organelle RNA recognition motif*) Proteine und ein Mitglied der OZ (*organelle zinc finger*) Proteinfamilie (zusammengefasst Sun et al. 2016, Yan et al. 2018). Eine Interaktion von PPR-Proteinen mit Mitgliedern dieser drei Familien konnte belegt werden. Man nimmt an, dass die verschiedenen Proteine in einem hochmolekularen Protein-Komplex, einem Editosom aggregieren, wobei die Zusammensetzung stark variiert (zusammengefasst in Sun et al. 2016, Bayer- Császár et al. 2017).

Zudem wurde ein Einfluss von CP31A, einem Mitglied der cpRNPs, auf 16 Edierungsstellen in Chloroplasten von *Arabidopsis* nachgewiesen (Tillich et al. 2009, Kap. 1.4.1.1).

1.3.3 Translation

Die plastidäre Translation ist für die pflanzliche Entwicklung essentiell und wird durch bakterienähnliche 70S-Ribosomen durchgeführt, welche aus einer kleinen 30S- und einer großen 50S-Untereinheit bestehen. Die meisten ribosomalen Proteine sind ortholog zu den plastidären ribosomalen Proteinen aus *E.coli* (zusammengefasst in Zoschke und Bock 2018). Doch in Chloroplasten existieren noch zusätzliche ribosomale Proteine (PSRP, *plastid specific ribosomal proteins*) ohne bakterielle Orthologe (Yamaguchi und Subramanian 2000, Yamaguchi et al. 2000, Tiller et al. 2012). Ein Teil der ribosomalen Proteine ist nukleär kodiert, die restlichen sind in den Plastiden kodiert, ebenso alle rRNAs und 30 tRNAs.

Aufgrund der konservierten Struktur und Organisation des Translationsapparates zwischen Bakterien und Chloroplasten, wird davon ausgegangen, dass der Ablauf der plastidären Translation stark der bakteriellen Translation ähnelt (Peled-Zehavi und Danon 2007).

Die Translation beginnt indem der Initiationskomplex, bestehend aus 30S-Untereinheit und Initiator-tRNA (fMet), mit einer Region in der 5'UTR der zu translatierenden mRNA interagiert. In den meisten Fällen handelt es sich dabei um die bakterientypische Shine-Dalgarno- (SD) Sequenz, welche mit der anti-Shine-Dalgarno-Sequenz in der 3'UTR der 16S rRNA assoziiert. Ungefähr 1/3 aller plastidären Transkripte in Tabak besitzen keine SD-Sequenz (Scharff et al. 2011). Solche mRNAs sind um das Start-Codon herum gering strukturiert, wodurch die SD-unabhängige Translation ermöglicht wird (Nakagawa et al. 2017, Scharff et al. 2017). Die Translation beginnt größtenteils am Startcodon AUG, selten sind auch GUG oder UUG möglich (Sugiura et al. 1998).

Letztendlich wird die 50S-Untereinheit rekrutiert und bildet das vollständige Ribosom, welches in der Elongationsphase die Proteinsynthese starten kann. Wird eines der drei Stopp-Codons (UAA, UAG oder UGA) erreicht, terminiert die Translation. Der Translationskomplex dissoziiert von der mRNA und wird für eine weitere Translationsrunde vorbereitet/recycelt. Zahlreiche Proteinfaktoren unterstützen den Ablauf der Translation, so existieren Initiations-, Elongations-, Terminations- und Ribosom-Recycling-Faktoren. Mit Ausnahme von IF1, welcher in vielen Pflanzen plastidär kodiert ist (Millen et al. 2001), sind alle anderen Proteinfaktoren im Zellkern kodiert (zusammengefasst in Tiller und Bock 2014). Ebenso nukleär kodiert sind viele mRNA-spezifische Transfaktoren der plastidären Translation. Zu den plastidären Transfaktoren zählen verschiedene RNA-Bindeproteine, von denen die meisten zu der PPR-Familie gehören (Übersicht in Zoschke und Bock 2018). Sie interagieren mit der 5'UTR der zu translatierenden mRNAs und besitzen, neben einem Translations-aktivierenden Einfluss, häufig zusätzliche Funktionen in der Stabilisierung und/oder Prozessierung (zusammengefasst Zoschke und Bock 2018). Zwei putative Oxidoreduktasen, HCF173 und HCF244, unterstützen zum Beispiel auf kooperative Weise die Initiation der Translation von D1 (kodiert durch *psbA*) und sind zusätzlich an der Stabilisierung der *psbA* mRNA beteiligt (Schult et al. 2007, Link et al. 2012).

1.4 RNA-Bindeproteine

Wie in den vorhergehenden Kapiteln beschriebenen, ist die Reifung plastidärer RNAs abhängig von der Assistenz zahlreicher RNA-Bindeproteine. Mit der Ausnahme von MatK (s. Kap. 1.3.2.2) werden alle RNA-Bindeproteine, die an posttranskriptionellen Modifikationen beteiligt sind, im Zellkern kodiert und posttranslational in die Plastiden importiert. Die größte Familie der RNA-Bindeproteine im Chloroplasten sind die Pentatricopeptid-Repeat- (PPR) Proteine, welche durch 2-30 Wiederholungen von einem 35 Aminosäuren umfassenden Peptid-Motiv gekennzeichnet sind. PPR-Proteine interagieren spezifisch mit einem oder wenigen Transkripten. Sie sind beteiligt an vielseitigen Prozessen der plastidären Gen-Expression: Transkription, RNA-Spleißen, RNA-Edierung, RNA-Spaltung, RNA-Stabilisierung und Translations-Initiation. (zusammengefasst in Barkan und Small 2014).

Neben den PPR-Proteinen existieren im Chloroplasten mehrere kleinere Proteinfamilien, darunter die Familie der cpRNPs, deren Mitglieder äußerst abundant sind und auf die in Kapitel 1.4.1.1 näher eingegangen wird.

1.4.1 Plastidäre Proteine mit RRM-Domänen

Die RRM (*RNA recognition motif*)-Domäne ist nicht nur das abundanteste RNA-Bindemotiv in *Arabidopsis* sondern auch das meist verbreitete innerhalb der Eukaryoten (Maronedz et al. 2016, Ruwe et al. 2011). Ein RRM ist ungefähr 80-90 Aminosäuren lang und wird durch zwei konservierte Sequenzen, ein Oktapeptid (RNP1) und ein Hexapeptid (RNP2) charakterisiert.

Die Sekundärstruktur einer RRM-Domäne ($\beta 1-\alpha 1-\beta 2-\beta 3-\alpha 2-\beta 4$) besteht aus einem viersträngigen antiparallelen β -Faltblatt ($\beta 2\beta 3\beta 1\beta 4$), an dem seitlich zwei α -Helices gepackt sind. Dabei ermöglichen aromatische Aminosäuren aus RNP1 und RNP2, welche sich jeweils in $\beta 3$ und $\beta 1$ befinden und so nebeneinander liegen, die Bindung von einzelsträngiger Nukleinsäure (Nagai et al. 1990, Maris et al. 2005). Zudem sind RRM-Domänen sehr biegsam und können mit einem weiten Spektrum an RNAs mit unterschiedlichen Affinitäten interagieren, ebenso mit Proteinen (zusammengefasst Shi et al. 2017).

In *Arabidopsis thaliana* werden potentiell 23 RRM Proteine in den Chloroplasten importiert (laut Ruwe et al. 2011). Davon besitzen zehn Proteine zwei RRM-Domänen und gehören zur Familie der cpRNPs, welche im nächsten Kapitel näher beschrieben werden. Die restlichen Proteine, ausgenommen PAB7, tragen nur eine RRM-Domäne (zusammengefasst in Ruwe et al. 2011, Shi et al. 2017). PAB7 ist ein Poly-A-Bindeprotein mit vier RRM-Domänen. Seine Funktion im plastidären RNA-Metabolismus ist noch unbekannt, ebenso fehlt bisher der Nachweis einer Interaktion mit RNA (Belostotsky 2003). Zu den restlichen, schon näher untersuchten plastidären RRM-Proteinen gehören Mitglieder der ORRM-Familie (*organelle RNA recognition motif*, ORRM1 und ORRM6) sowie RBD1, S-RBP11 und ein PPR Protein (PPR4). Die Proteine sind an verschiedenen posttranskriptionellen Prozessen beteiligt. PPR4 ist ein Trans-Spleißfaktor für *rps12* (Schmitz-Linneweber et al. 2006). RBD1 ist mit verantwortlich für die Prozessierung der 23S rRNA und die beiden ORRM Proteine (ORRM1 und ORRM6) sind an der Edierung plastidärer RNAs beteiligt (Sun et al. 2013, Hackett et al. 2017). Des Weiteren spielen einige der Proteine innerhalb der pflanzlichen Stressantwort eine Rolle. So zeigen Mutanten von ORRM1 und RBD1 einen Kältesensitiven Phänotyp und S-RBP11 ist in der Antwort auf oxidativen Stress und Salzstress involviert (zusammengefasst Shi et al. 2017).

1.4.1.1 Chloroplastidäre Ribonukleoproteine

Für Landpflanzen ist weitgehend unbekannt, welche Schritte des äußerst komplexen chloroplastidären RNA-Metabolismus reguliert werden. Bei einer wahrhaftigen Regulation sind die Schritte für die Genexpression raten-limitierend. Lediglich für die Grünalge *Chlamydomonas* existieren einige Studien, die eine wahre Regulation im Chloroplasten belegen (zusammengefasst in Choquet und Wollman 2009). Ein potentieller Regulator sollte auf externe und interne Stimuli reagieren und eine Funktion innerhalb des plastidären RNA-Metabolismus ausüben. In Landpflanzen trifft dies auf die Mitglieder der chloroplastidären Ribonukleoproteine (cpRNPs) zu (Tillich et al. 2010) und macht sie somit zu einem äußerst spannenden Forschungsobjekt. Im Folgenden wird auf diese Proteinfamilie eingegangen und anschließend ihre bisher bekannten Funktionen erläutert.

Die Vertreter der cpRNPs zeichnen sich durch ihre konservierte Domänenstruktur aus (Abb. 2). Einem N-terminalen Chloroplasten-Importsignal (Transit-Peptid), welches nach dem Transport in den Chloroplasten abgespalten wird, folgen eine saure Region (*acidic domain*), die reich an Asparaginsäure- und Glutaminsäure-Resten ist, und zwei RRM-Domänen.



Abb. 2: Schematische Domänenstruktur eines cpRNPs

Das N-terminale Transit-Peptid gewährleistet den Import in den Chloroplasten. Es folgt die Saure Domäne, welche saure Aminosäuren wie Asparaginsäure und Glutaminsäure enthält. Die zwei RRM- (*RNA recognition motif*) Domänen enthalten zwei Konsensus-Abschnitte (RNP1 und RNP2), in denen aromatische Aminosäuren für die RNA-Interaktion essentiell sind. Verbunden werden die zwei RRM-Domänen durch eine Linkerregion.

Die cpRNPs stammen nicht von cyanobakteriellen Genen ab, sondern sind am engsten mit einigen Vertretern eukaryotischer RRM-Proteine, den heterogenen nukleären Ribonukleoproteinen (hnRNPs) verwandt (u.a. hnRNP A1 und hnRNP A2, Maruyama et al. 1999). Die hnRNPs binden multiple RNAs und übernehmen vielfältige Aufgaben in der RNA-Prozessierung, Translokation und Translation (Dreyfuss et al. 2002). Zudem sind einige Mitglieder an der Regulation der Gen-Expression beteiligt (Chaudhury et al. 2010). Die cpRNPs sind ebenfalls in der Lage mit verschiedenen Nukleinsäuren zu interagieren (ssDNA, dsDNA und RNA, Li und Sugiura 1990 und 1991). Die stärkste Assoziation besteht mit Ribonukleinsäuren (Ye und Sugiura 1992), wobei eine Präferenz für PolyU- und PolyG-Ribohomopolymere beschrieben wurde (Li und Sugiura 1991, Lisitsky et al. 1995). Später konnte die *in vitro* und *in vivo* Interaktion mit spezifischen plastidären mRNAs belegt werden, wobei rRNAs und intronlose tRNAs nicht bzw. nur schwach an die cpRNPs binden

(Nakamura et al. 1999, Nakamura et al 2001, Kupsch et al. 2012). Da die cpRNPs nicht mit polysomalen RNAs interagieren (Lisitsky et al. 1995, Nakamura et al. 1999), wird ihnen vor allem eine Funktion vor der Translation innerhalb posttranskriptioneller Prozesse zugeschrieben, s. Kap. 1.4.1.2.

Mitglieder der cpRNP-Familie wurden bereits in vielen Vertretern höherer Pflanzen identifiziert: Tabak (Nakamura et al. 2004), Spinat (als RNPs in Loza-Tavera et al. 2006), Arabidopsis (Ohta et al. 1995, als ATRBP in Cheng et al. 1994, STEP1 in Kwon und Chung 2004), Gerste (Churin et al. 1999), Mais (als NBPs in Cook und Walker 1992), Reis (als RNPs in Kleffmann et al. 2007), Avocado (als PARBPs in Daros et al. 2002) und Kartoffel (als SEBF in Boyle und Brisson 2001).

Anhand phylogenetischer Analysen lassen sich die zehn Mitglieder der cpRNPs aus *Arabidopsis thaliana* in verschiedene Cluster unterteilen (Ohta et al. 1995). Dabei befinden sich CP29A und CP29B, die aufgrund der phylogenetischen Analyse eng verwandt sind, in einem Cluster mit CP31A und CP31B, welche wiederum eng verwandt sind (Ruwe et al. 2011). Interessanterweise stammt der Hauptteil der funktionellen Erkenntnisse der Arabidopsis cpRNPs von drei der vier Mitglieder dieses Clusters (CP31A, CP29A und CP31B s. Kap. 1.4.1.2). Mit Ausnahme von CP29C/PSRP2 sind die Funktionen der anderen Vertreter aus Arabidopsis (CP33A, CP33B, CP33C, CP28A und CP28B) noch unerforscht. Bisher ist unklar ob eine phylogenetische Verwandtschaft auch eine ähnliche Funktionsweise bedeutet.

Vorhersage-Algorithmen zur subzellulären Lokalisation sowie *Shotgun*-Proteom-Analysen identifizierten alle zehn Arabidopsis Mitglieder im Chloroplasten (Übersicht in Ruwe et al. 2011). GFP-Fusionen mit CP29A (Raab et al. 2006), CP29C (Xu et al. 2013), CP31A, CP31B und CP29B (Fu et al. 2007) bestätigten die chloroplastidäre Lokalisation. Innerhalb der Chloroplasten ist das Stroma der Hauptbestimmungsort der cpRNPs, wobei geringe Anteile auch mit den Thylakoiden assoziieren. Dies wurde durch immunologische Analysen für die fünf Vertreter aus Tabak nachgewiesen (Nakamura et al. 1999).

Außer in den Plastiden, wurden die cpRNPs in einigen Veröffentlichungen zusätzlich im Cytoplasma bzw. im Zellkern identifiziert, wie z.B. SEBF (*silencing element binding factor*), aus der Kartoffel und ein Homolog von CP29B aus Arabidopsis. SEBF fungiert als Transkriptions-Repressor von PR-10a (*pathogenesis-related*), dessen Genprodukt an der Pathogenabwehr beteiligt ist und durch *in vitro* Bindestudien im Zellkern nachgewiesen wurde (Boyle und Brisson 2001, Gonzalez-Lamothe et al. 2008). Zudem wurde in Arabidopsis eine verkürzte Version von CP31A (STEP1 genannt) entdeckt, welches an Telomere binden kann (Kwon und Chung 2004), sowie CP29A in geringen Mengen

immunologisch im Zellkern identifiziert (Gosai et al. 2015). Der größte Proteinanteil der cpRNPs akkumuliert jedoch im Chloroplasten. So wurden die cpRNPs als äußerst abundante plastidäre Proteine nachgewiesen, mit vergleichbaren Proteinmengen wie die plastidären Ribosomen (Nakamura et al. 2001).

Die Expression der cpRNPs wird erheblich durch verschiedene externe und interne Signale reguliert. Insbesondere Licht und verschiedene Pflanzenhormone führen zu einer Akkumulation der cpRNPs (zusammengefasst Ruwe et al. 2011). Zusätzlich ist Licht ein Signal für verschiedene posttranslationale Modifikationen der cpRNPs. So konnte eine lichtabhängige Phosphorylierung für 28RNP und 24RNP aus Spinat (Lisitsky und Schuster 1995), sowie für RNP29 aus Reis (Kleffmann et al. 2007) und die lichtabhängige N-terminale Acetylierung für CP29A und CP29B aus Arabidopsis beobachtet werden (Wang et al. 2006). Die Phosphorylierung von 28RNP und 24RNP verändert die Bindeaffinität gegenüber der *petD* 3'UTR, wodurch deren Stabilität und 3'Endprozessierung *in vitro* beeinflusst werden (Loza-Tavera et al. 2006, Vargas-Suarez et al. 2013). In Arabidopsis ist die *in vivo* Phosphorylierung von CP31A, CP29A, CP29B und CP33B belegt (Reiland et al. 2009), ob diese ebenfalls einen Einfluss auf die Funktion der cpRNPs ausübt, ist noch unklar.

Da die Funktion und Expression der cpRNPs durch äußere und innere Stimuli reguliert werden, die cpRNPs mit multiplen RNAs interagieren und diese prozessieren (s. Kap. 1.4.1.2), sowie eine enge Verwandtschaft mit hnRNPs besteht, wird den cpRNPs eine potentielle Funktion als Regulatoren des plastidären RNA-Metabolismus zugeschrieben (Tillich et al. 2010).

1.4.1.2 Funktionen der cpRNPs im plastidären RNA-Metabolismus

Die Rolle der cpRNPs innerhalb des plastidären RNA-Metabolismus wurde hauptsächlich durch funktionelle Studien von drei verschiedenen Pflanzenspezies (Spinat, Tabak und Arabidopsis) aufgeklärt. In den Untersuchungen wird allgemein deutlich, dass die cpRNPs an vielseitigen posttranskriptionellen Prozessen beteiligt sind.

In Spinat wurde 1991, bei der Suche nach 3'End-Prozessierungsfaktoren, das cpRNP 28RNP identifiziert. Die Depletion von 28RNP aus einem Chloroplastenextrakt führt zu einer verminderten 3'Endprozessierung von *in vitro* synthetisierten RNAs (Schuster und Gruissem 1991). Später wurde ein weiteres cpRNP entdeckt, 24RNP, welches redundant mit 28RNP an der 3'-Endprozessierung und Stabilisierung des *petD*-Vorläufers beteiligt ist. Diese Prozesse

werden dabei u.a. durch den Phosphorylierungsstatus der beiden cpRNPs reguliert (Vargas-Suarez et al. 2013).

Ebenfalls durch Depletions-Experimente der fünf Tabak cpRNP-Mitglieder konnte ein Einfluss auf die 3'Endprozessierung, sowie auf die Stabilität von *in vitro* synthetisierten RNAs (3'UTR *petD* bzw. *psbA*) gezeigt werden (Nakamura et al. 1999, 2001). Zudem wurde in einem *in vitro* Edierungssystem eine Beteiligung von CP31 an der Edierung von zwei plastidären Transkripten (*psbL*, *ndhB*) belegt (Hirose und Sugiura 2001).

In Arabidopsis wurden bisher vier von zehn Vertretern der cpRNPs näher untersucht (CP31A, CP29A, CP31B und CP29C/PSPR2). CP31A interagiert mit der 3'UTR von *ndhF*, ist an der Stabilisierung des *ndhF*-3'Endes und an dessen Endprozessierung beteiligt. Die Destabilisierung des reifen 3'Endes von *ndhF*, führt in den *cp31a*-Mutanten zu einer drastischen Reduktion der reifen *ndhF* mRNA (Kupsch et al. 2012, Tillich et al. 2009). Der Verlust von CP31A führt ebenfalls zu einer Reduktion der Edierungseffizienz von 13 Edierungsstellen innerhalb acht verschiedener plastidärer Transkripte. CP31B unterstützt die plastidäre Edierung an spezifischen *cp31a*-abhängigen Stellen. So zeigen Doppelmutanten von CP31A und CP31B stärkere Edierungsdefekte, als *cp31a*-Einzelmutanten (Tillich et al. 2009).

Werden *cp31a*- und *cp29a*-Mutanten bei 8°C angezogen, kommt es zur Ausprägung eines kältesensitiven Phänotyps. Auf molekularer Ebene lassen sich in den Mutanten unter Kältebedingungen reduzierte Mengen vieler mRNAs, sowie Prozessierungsdefekte bestimmter Transkripte, 23S rRNA, *ycf3*, *rpl33* (nur CP31A) und *rpoCl* (nur CP29A), nachweisen (Kupsch et al. 2012). Damit sind CP31A und CP29A essentiell, um Arabidopsis gegen Kältestress zu schützen. Insgesamt sind mehrere Vertreter der cpRNPs an verschiedenen Stressantworten beteiligt (zusammengefasst in Shi et al. 2017). So wurde für CP29C eine Funktion als negativer Regulator der Samenkeimung und des Keimlingswachstums unter abiotischen Stressbedingungen (Dehydrierung, Salz- und Kältestress) vorgeschlagen (Xu et al. 2013). Zudem steigt die Expression einiger Vertreter der cpRNPs drastisch nach Kälteeinwirkung an (zusammengefasst in Ruwe et al. 2011).

Womöglich nimmt eine in den cpRNPs vorhandene RNA-Chaperon-Aktivität unter Kältestress an Bedeutung zu, welche RNA-Sekundärstrukturen auflöst bzw. vor Fehlfaltungen bewahrt und dadurch ermöglicht, dass weitere RNA-Prozessierungsfaktoren binden können (Ruwe et al. 2011). Allgemein neigen RNAs dazu sich in nicht-funktionelle Strukturen zu falten (Herschlag 1995). RNA-Chaperone unterstützen das Auflösen von RNA-Fehlfaltungen bzw. das Aufrechterhalten des aktiven funktionellen Status der RNA (Rajkowitsch et al. 2007). Für einige cpRNPs wurde eine Aktivität als RNA-Chaperon bereits beschrieben.

PARBP33, ein cpRNP aus der Avocado, erleichtert durch seine Chaperon-Aktivität die *hammerhead*-vermittelte Selbstspaltung einer Viroid-RNA (Daros und Flores 2002). CP29C bzw. auch PSRP-2 (*plastid-specific ribosomal protein 2*) genannt, ist ein fester, aber nicht essentieller Bestandteil des plastidären Translationsapparates (Tiller et al. 2012, Ruwe et al. 2011). Es interagiert mit der 16S rRNA innerhalb der 30S-Untereinheit der Ribosomen (Yamaguchi und Subramanian 2003, Sharma et al. 2007). CP29C ist in der Lage den kältesensitiven Phänotyp von RNA-Chaperon-defizienten *E.coli*-Zellen zu komplementieren und Basenpaarungen aufzuschmelzen (Xu et al. 2013).

1.5 Zielstellung

Die cpRNP-Proteine aus *Arabidopsis thaliana*, deren Funktionsweise bisher näher analysiert wurde (CP31A, CP31B, CP29A), sind phylogenetisch eng miteinander verwandt. In dieser Studie werden zwei cpRNP-Proteine, CP33A und CP33B, die außerhalb dieses Clusters liegen und bisher weitgehend unerforscht sind, untersucht.

Zunächst soll durch Biochemische-Analysen und Fluoreszenzmikroskopie-Studien die plastidäre Lokalisation von CP33A und CP33B, welche durch Vorhersage-Algorithmen der subzellulären Lokalisation und Proteomstudien belegt wird, bestätigt werden. Um die *in vivo* Interaktionen mit plastidären Transkripten zu untersuchen, werden CP33A und CP33B präzipitiert und die gebundenen RNAs auf einem Plastom überspannenden *Microarray* (RIP-Chip) analysiert. Zudem soll die Bindestelle innerhalb der Zieltranskripte von CP33B, durch einen Oligonukleotid-Array und in einer *in vitro* Bindestudie, weiter eingeeengt werden.

Mit Hilfe von molekularbiologischen Analysen der *cp33a*- und *cp33b*-Nullmutanten, soll eine mögliche Funktion bei der Reifung plastidärer RNAs aufgedeckt werden, welche für andere Mitglieder der cpRNPs bereits belegt wurde. Neben Untersuchungen der Transkriptmengen werden auch Defekte in der intercistronischen Prozessierung, sowie Spleiß- und Edierungsdefekte analysiert.

Eine Beteiligung der cpRNPs bei verschiedenen Stressantworten wurde bereits nachgewiesen. Stress kann die Dissoziation der Polysomen verursachen. Womöglich interagieren cpRNPs mit den von Polysomen dissoziierten RNAs und übernehmen somit eine Funktion in der Stressantwort. In dieser Arbeit wird diese Annahme für CP33A, unter der Verwendung des Antibiotikums Puromycin, untersucht. Zudem wird das Wachstum von *cp33b*-Mutanten, welche unter Standardbedingungen phänotypisch unauffällig sind, unter verschiedenen Stressfaktoren getestet.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und molekularbiologische Reagenzien

Alle verwendeten Chemikalien und molekularbiologischen Reagenzien (u.a. Enzyme, Größenstandards) stammen, wenn nicht anders angegeben, von folgenden Firmen: Carl Roth GmbH, Sigma-Aldrich, Biozym Scientific, Bio-Rad und Thermo-Scientific.

Alle wässrigen Lösungen wurden mit *A. bidest* (deionisiertes, destilliertes Wasser, PURELAB-Ultra-System, Veolia) angesetzt.

2.1.2 Geräte und Anbieter

PCR-Analysen wurden mit dem T3000 *Thermocycler* (Biometra®) und dem C1000 Touch™ *Thermal Cycler* (Bio-Rad) durchgeführt. Für Zentrifugationen wurden hauptsächlich BIOFUGE® FRESCO, Heraeus Tischzentrifugen (Thermo-Scientific), verwendet.

Eine Liste der Anbieter von Geräten und von denen Materialien bezogen wurden, findet sich im Anhang, Tabelle 13.

2.1.3 Pflanzenmaterial

In dieser Arbeit wurden ausnahmslos *Arabidopsis thaliana* Pflanzen verwendet. Sowohl die Wildtyp-Pflanzen, als auch die Pflanzen der verschiedenen T-DNA-Insertionslinien (Tabelle 1) entsprechen dem Ökotyp Columbia-0 (Col-0). Die Samen wurden von ABRC (*Arabidopsis biological resource center*), NASC (*Nottingham Arabidopsis Stock Center*), GABI (Genomanalyse im biologischen System Pflanze) oder von der SK Collection (*Agriculture and Agri-Food Canada*) bezogen.

Tabelle 1: In dieser Arbeit verwendete Arabidopsis T-DNA-Insertionslinien

Name der Mutante	Art der Mutation	Datenbank-Bezeichnung	Betroffenes Gen
<i>cp33a-1</i>	T-DNA-Insertion	SALK_151814	AT3g52380
<i>cp33a-2</i>	T-DNA-Insertion	SALK_102657	AT3g52380
<i>cp33a-3</i>	T-DNA-Insertion und -Deletion	CS16232	AT3g52380
<i>cp33b-1</i>	T-DNA-Insertion	SALK_068298	AT2g35410
<i>cp33b-3</i>	T-DNA-Insertion	GK-044F06	AT2g35410
<i>cp33b-4</i>	T-DNA-Insertion	SK31607	AT2g35410

2.1.4 Antikörper und Oligonukleotide

Eine Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Antikörper und Oligonukleotide befindet sich im Anhang Tabelle 4 und Tabelle 3. Oligonukleotide wurden bei Sigma Aldrich oder Eurofins MWG Operon bezogen.

2.2 Methoden

2.2.1 Pflanzenanzucht

Pflanzenanzucht auf Erde

Arabidopsis thaliana Pflanzen wurden wenn nicht anders beschrieben auf einer Mischung aus Erde (Einheitserde GS90; Gebrüder Patzer) mit einem Drittel Vermiculite (4:1; 2-6mm, Floragard) oder Quarzsand (Körnung: 3mm - 5mm) angezogen. Die Pflanzen wurden standardmäßig unter Langtagbedingungen (16h Licht/8h Dunkelheit) in Pflanzenanzuchtkammern bei $\sim 120\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ und 23°C angezogen.

Drei verschiedene Lichtintensitäten wurden innerhalb der Lichtstressexperimente getestet. Die Starklichtbedingungen ($1000\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ und $600\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) fanden in Anzuchtschränken der Firma Percival statt und Schwachlicht ($20\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) wurde in hauseigenen Anzuchtkammern, unter einer abdunkelnden Folie durchgeführt. Kältestress (8°C) und fluktuierende Lichtbedingungen (im Wechsel 5min $50\text{-}60\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ und 1min $500\text{-}550\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) wurden ebenfalls in Percivals absolviert.

Pflanzenanzucht auf Festmedium

Alle auf Festmedium kultivierten Pflanzensamen, wurden zunächst oberflächensterilisiert (s. Kap. 2.2.2) und im Dunkeln für 4 Tage bei 4°C stratifiziert. Die Anzucht der zwei Knockout *cp33a*-Pflanzenlinien (*cp33a-1* und *cp33a-3*) sowie deren Phänokopien (Wildtyp-Pflanzen auf Spectinomycin ($500\mu\text{g}/\text{ml}$) bzw. Norflurazon ($1,5\mu\text{g}/\text{ml}$)) erfolgte auf MS-Medium mit 3% Zucker. Die Anzuchtbedingungen waren wie oben beschrieben.

MS-Medium: 0,44% (w/v) Murashige & Skoog Medium (Duchefa), 3% (w/v) Saccharose, 0,05% (w/v) MES (pH 5,7 mit KOH), 0,9% Pflanzenagar (Duchefa)

MS-Medium mit Spec: MS-Medium s.o. inklusive Spectinomycin-Dihydrochlorid-Pentahydrat ($500\mu\text{g}/\text{ml}$, Duchefa)

MS-Medium mit NF: MS-Medium s.o. inkl. Norflurazon ($1,5\mu\text{g}/\text{ml}$, Sigma)

2.2.2 Samensterilisation

Zur sterilen Anzucht von Pflanzen auf Medien, wurden die Oberflächen der Samen sterilisiert. Pro Platte wurden ~10µl Samen in 1ml Sterilisationslösung max. 7 Minuten in einem Überkopfschüttler inkubiert. Anschließend wurden die Samen unter sterilen Bedingungen fünfmal mit je 1ml steril-autoklaviertem H₂O gewaschen.

Sterilisationslösung: 30% (v/v) DanKlorix, 0,8% (v/v) N-Lauroylsarcosin

2.2.3 Antikörper-Produktion

Die Proteinsequenz des C-terminalen Endes von CP33A und CP33B sind jeweils einzigartig innerhalb der cpRNP-Familie. Daher wurden Peptide aus dieser Region zur Herstellung von polyklonalen Antikörpern gewählt (Abb. 3). Für CP33A wurden zwei Peptidantikörper entwickelt. Peptid „a“ (NH₂-CALRLNLASEREKPT-CONH₂, im folgenden anti-CP33A-a genannt) überlappt mit der zweiten RRM-Domäne und der C-terminalen Region und kam in Western-Analysen zum Einsatz. Peptidantikörper „b“ (NH₂-CEGETEEA-SLESNEVLSNVSA-CONH₂, im folgenden anti-CP33A-b genannt) detektiert den absoluten C-Terminus und ist in der Lage, CP33A in Immunopräzipitations-Experimenten zu präzipitieren (s. Kap. 2.2.17). Anti-CP33B (NH₂-CGDSVEANNASEDGD-CONH₂) wurde sowohl in Western als auch in Immunopräzipitations-Experimenten genutzt. Die Immunisierung von Kaninchen mit den oben genannten Peptiden und die Affinitätsaufreinigung der polyklonalen Antikörper Eluate wurden von der Firma Pineda durchgeführt.

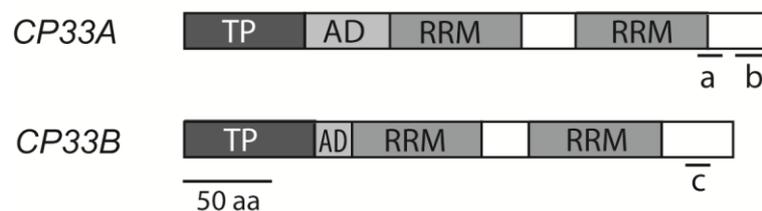


Abb. 3: Antikörperherstellung von CP33A und CP33B

In der Abbildung sind die Abschnitte gekennzeichnet (schwarze Linien), welche für die Herstellung polyklonaler Antikörper für CP33A und CP33B verwendet wurden. Für CP33A wurden zwei Antikörper entwickelt; Antikörper a kam in Western-Analysen zum Einsatz und Antikörper b in Immunopräzipitations-Experimenten. Der Antikörper für CP33B wurde von einem Peptid aus dem C-Terminus entwickelt und wurde in Western-Analysen und Immunopräzipitations-Experimenten verwendet. TP: Transit-Peptid, AD: saure Domäne (*acidic domain*), RRM: RRM-Domäne (*RNA recognition motif*).

2.2.7 Genotypisierung

Um die T-DNA-Insertionslinien (s. Kap. 2.1.3) zu genotypisieren, wurde die DNA mittels einer Schnellextraktionsmethode nach Edwards et al. (1991) isoliert. Ein Blattstück (ca. 5mm Durchmesser) wurde in einem 1,5ml Reaktionsgefäß auf Eis mit einem Pistill zerkleinert und in 700µl Extraktionspuffer aufgenommen. Nach der Fällung mit 1Vol. Isopropanol, wurde das DNA-haltige Pellet mit 70% Ethanol gewaschen und anschließend in 25µl TE-Puffer resuspendiert. In den anschließenden PCR-Reaktionen (s. Kap. 2.2.8) wurden 1µl der DNA-Lösungen, sowie zwei genspezifische Primer oder ein genspezifischer mit einem T-DNA spezifischem Primer, verwendet. Die PCR-Produkte wurden einmalig, zur genauen Überprüfung der Insertionsstelle, durch Sequenzierung (SMB) untersucht.

Extraktionspuffer: 200mM Tris-HCl (pH 7,5), 250mM NaCl, 25mM EDTA, 0,5% (w/v) SDS

TE-Puffer: 10mM Tris-HCl (pH 8,0), 1mM EDTA (pH 8,0)

2.2.8 Polymerase-Kettenreaktion

Die in dieser Arbeit durchgeführten PCR-Reaktionen erfolgten entweder mit einer rekombinanten DNA-Polymerase I aus *Thermus aquaticus* (Taq-Polymerase) oder der Phusion® *High-Fidelity* DNA-Polymerase (Fermentas) nach Herstellerangaben. Die Taq-Polymerase wurde im Labor aus *E.coli* DH5α Stämmen aufgereinigt (nach dem Protokoll von Desai und Pfaffle 1995). Eine Standard-PCR Reaktion enthielt 1x PCR-Puffer, 0,2µM Vorwärts- und Rückwärts-Primer, 0,2mM dNTPs (Thermo Scientific), 1/50 Polymerase und Template DNA (zwischen 1ng und 100ng). Ein Standard-PCR Programm ist unten dargestellt. Die Annealing-Temperaturen ergaben sich abhängig von den Primersequenzen.

10x PCR-Puffer: 200mM Tris-HCl (pH 8,8), 100mM KCl, 100mM (NH₄)₂SO₄, 20mM MgSO₄, 1% (v/v) Triton X-100

	Dauer	Temperatur
Initial-Denaturierung	3 min	94°C
	35 Zyklen	
Denaturierung	30s	94°C
Annealing	30s	45-60°C
Elongation	1min/kb	72°C
Auffüll-Elongation	5min	72°C
Kühlung	∞	15°C

2.2.9 Agarosegelelektrophorese

Zur analytischen Auftrennung von DNA und zur Qualitätskontrolle von RNA wurde die Agarosegelelektrophorese verwendet (Sambrook und Russell 2001). DNA-Proben wurden mit 0,1Vol. 10x Ladepuffer gemischt und RNA-Proben vor ihrer Denaturierung (5min bei 75°C) mit 0,5Vol. 2x RNA *Loading Dye* (Thermo Scientific). Die Nukleinsäureproben wurden in Agarosegelen (0,8-2,0% (w/v) Agarose in 1x TAE-Puffer plus 0,2µg/ml Ethidiumbromid) in Laufpuffer (1x TAE-Puffer) bei einer konstanten Spannung von 70 – 100 Volt, aufgetrennt. Als Größenstandard dienten GeneRuler™ 1kb DNA Ladder und 100bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific). Die Nukleinsäure-Banden wurden durch UV-Transillumination (302nm; Gel Doc XR, Bio-Rad) visualisiert.

1x TAE-Puffer: 40mM Tris-Acetat (pH 8,0), 1mM EDTA (pH 8,0)

10x Ladepuffer: 50% (v/v) Glycerol, 2% (v/v) 50x TAE, 1mM EDTA, (pH 8,0), 0,05% (w/v) Bromphenolblau, 0,05% (w/v) Xylencyanol

2.2.10 Northern Blot

2.2.10.1 Denaturierende RNA-Agarosegelelektrophorese und –Transfer

RNA-Proben wurden in einem denaturierenden Agarosegel, welches Formaldehyd enthielt, elektrophoretisch aufgetrennt (Sambrook und Russell 2001). Zuvor wurde die RNAs mit 2,5 - 4 Vol. RNA-Probenpuffer(A) vermischt, für 15min bei 75°C denaturiert und anschließend mit 0,1Vol. 10x RNA-Ladepuffer versetzt. Die Elektrophorese erfolgte in einem horizontalen Gel-Elektrophorese-System, welches durch Eis gekühlt wurde, bei 100-120 Volt in 1x MOPS-Laufpuffer (pH 7,0). Als Größenstandard diente 0,5µg RiboRuler™ RNA Ladder (*High Range* bzw. *Low Range*, Fermentas). Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die RNAs durch einen Kapillarblot (Sambrook und Russell 2001) auf Nylonmembranen (Hybond-N, GE Healthcare) in 5x SSC über Nacht transferiert. Durch UV-Bestrahlung (150mJ/cm, GS-GeneLinker-UV Kammer, Bio-Rad) erfolgte die Immobilisierung der RNAs auf den Membranen. Die Färbung mit Metylenblau, bei der abundante, ribosomale RNA-Banden sichtbar werden, ermöglichte die Qualitätskontrolle des RNA-Transfers.

<u>RNA-Probenpuffer(A):</u>	12,5% (v/v) 10x MOPS (pH 7,0), 25% (v/v) Formaldehydlösung (37%), 62,5% (v/v) deionisiertes Formamid
<u>10x RNA-Ladepuffer:</u>	50% (v/v) Glycerol, 10% (v/v) 10x MOPS, 10mM EDTA (pH 8,0), 0,25% (w/v) Bromphenolblau, 0,25% (w/v) Xylencyanol, steril filtriert
<u>RNA-Agarosegel:</u>	1% (w/v) Agarose (Certified™ Molecular Biology Agarose, Bio-Rad) in <i>A. bidest</i> , 10% (v/v) 10x MOPS (pH 8,0) und 17% (v/v) Formaldehydlösung (37%)
<u>10x MOPS-Puffer:</u>	200mM MOPS, 10mM EDTA, 80mM NaOAc (pH 7,0 bzw. 8,0 mit NaOH)
<u>5x SSC:</u>	0,75M NaCl, 0,075M Natriumcitrat (pH 7,0 mit HCl)
<u>Methylenblaulösung:</u>	0,3M NaAc (pH 5,2), 0,03% (w/v) Methylenblau

2.2.10.2 Denaturierende RNA-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) und -Transfer

Zur Detektion von kleineren RNAs (tRNAs, fragmentierte und verdaute RNAs) wurden Polyacrylamidgele, mit Harnstoff als Denaturierungsmittel, verwendet. Nach der Polymerisierung absolvierten die Gele einen mind. 15-minütigen Vorlauf im Mini-PROTEAN® System (Bio-Rad) in 1x TBE. Die RNA-Proben wurden in 1 Vol. RNA-Probenpuffer(B) für 15min bei 75°C denaturiert und neben einem Größenmarker (0,5µg RiboRuler™ RNA Ladder *Low Range*, Fermentas) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 Volt, ebenfalls in 1x TBE. Im Anschluss wurden die Gele mit Ethidiumbromid gefärbt (0,2µg/ml in 0,5x TBE) für 2 Minuten und mit 0,5x TBE gespült. Die RNA-Banden wurden durch UV-Transillumination (302nm; Gel Doc XR™, Bio-Rad) visualisiert.

Der Transfer der RNA-Banden auf eine Nylonmembran (Hybond-N, GE Healthcare) erfolgte in 0,5x TBE ebenfalls in einem Mini-PROTEAN® System (Bio-Rad) für 1h bei 100 Volt. Anschließend wurde die Membran wie zuvor in Kap. 2.2.10.1 beschrieben behandelt

Material und Methoden

RNA-Probenpuffer(B): 95% (v/v) deionisiertes Formamid, 1mM EDTA, 0,02% (w/v) SDS, etwas Bromphenolblau und Xylencyanol

10 x TBE: 0,89M Tris, 0,89M Borsäure, 20mM EDTA

RNA-Gel: 0,1Vol 10x TBE, 9 % Acrylamid, 8M Harnstoff, 0,1% (v/v) TEMED, 0,05% (v/v) APS

2.2.11 *Dot-Blot*-Analysen

Gleiche Anteile der isolierten RNA aus Präzipitat und Überstand-Fractionen der Ko-Immunoprecipitations-Experimente (s. Kap. 2.2.17) wurden für eine *Dot-Blot*-Analyse verwendet. Die RNA wurde zunächst mit einem Denaturierungs-Puffer versetzt (80µl pro *Dot*) und für 15min bei 75°C denaturiert. Nach der Zugabe von 20xSSC (30µl pro *Dot*) konnte die RNA-Lösung mit einer Mikrofiltrationsapparatur (Bio-Dot® *SF Microfiltration Apparatus*, Bio-Rad) und einer Vakuumpumpe auf eine Hybond N-Nylonmembran (GE Healthcare) geblottet werden. Die Membran wurde anschließend mit 5x SSC gewaschen, UV gecrosslinked (150mJ/cm) und mit Methylenblau angefärbt. Die Hybridisierung mit radioaktiv markierten RNA- bzw. Oligonukleotid-Sonden erfolgte wie beschrieben in Kap. 2.2.12.

Denaturierungs-Puffer: 66% (v/v) deionisiertes Formamid, 21% (v/v) Formaldehydlösung (37%); 13% (v/v) MOPS Puffer (pH 7,0)

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

2.2.12 Markierung von RNA-, Oligonukleotid- und PCR-Sonden

Es wurden drei verschiedene Arten von Sonden für Northern- (Kap. 2.2.10) bzw. *Dot-Blot*-Analysen (Kap. 2.2.11) verwendet, deren radioaktive Markierung auf unterschiedliche Weise erfolgte (genauere Beschreibung siehe unten). Nach der Markierung wurden nicht eingebauten Nukleotide über Gelfiltrations-Säulen (illustra MicroSpin G50 (RNA-Sonden) bzw. G25 (DNA-Sonden), GE Healthcare) beseitigt.

RNA-Sonden

Über Standard-PCR-Reaktionen (s. Kap. 2.2.8) wurden die Templates für die *in vitro* Transkription amplifiziert. Dabei wurde die Sequenz des T7-Promotors durch die Verwendung von entsprechenden reversen Primern eingefügt (Primersequenzen s. Tabelle 3). Die RNA-Synthese erfolgte in Anwesenheit von 50µCi $\alpha^{32}\text{P}$ -UTP (Hartmann Analytics) und nach Herstellerangaben der T7-RNA-Polymerase (Thermo Scientific).

Oligonukleotid-Sonden

Oligonukleotide (100 µM) wurden mit Hilfe der Polynukleotidkinase (PNK, Fermentas) nach Herstellerangaben mit 50µCi $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP (Hartmann Analytics) radioaktiv endmarkiert.

PCR-Sonden

Über Standard-PCR-Reaktionen wurden PCR-Produkte amplifiziert, welche anschließend mit dem DecaLabel™ DNA Labeling Kit (Thermo Scientific) nach Herstellerangaben mit 50µCi $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP (Hartmann Analytics) radioaktiv markiert wurden.

2.2.13 Hybridisierung und Detektion von radioaktiven Sonden

Die RNA-tragenden Nylonmembranen der Northern- (s. Kap. 2.2.10) und *Dot-Blots* (s. Kap. 2.2.11) wurden für mind. 1h bei 68°C in Church-Puffer prähybridisiert. Anschließend erfolgte die Zugabe der radioaktiv markierten Sonden (s. Kap. 2.2.12) und die Hybridisierung über Nacht. Wobei die Oligonukleotid- und PCR-Sonden vor der Verwendung für 5 min bei 95°C denaturiert wurden. Die Hybridisierungstemperatur und die Waschungen der Membranen variierten abhängig von den Sonden (siehe unten). Die Signale wurden durch Autoradiographie auf einem Phospho-Imager-Screen exponiert und mittels des Phosphorimagers (Molecular Imager FX, Bio-Rad) visualisiert. Die Software Quantity-One (Bio-Rad) diente der Detektion und Quantifizierung.

Sonde	Hybridisierungstemperatur	Waschungen
RNA-Sonde	68°C	je 15min in drei Puffern: 0,2x SSC/0,1% SDS, 0,1x SSC/0,1% SDS 0,05x SSC/0,1% SDS
Oligonukleotid-Sonde	45°C (Sonde: trnAex1, trnGprobe, rbcL) 50°C (Sonde: psbA-10a und psbA-7)	einmal 15min in 1x SSC/0,5% SDS zweimal 15min in 0,5x SSC/0,1% SDS.
PCR-Sonde	55°C	einmal 15min in 0,5x SSC/0,1% SDS, zweimal 15 min in 0,2x SSC/0,1% SDS

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

2.2.13.1 Entfernen von radioaktiven Sonden

Zur Wiederverwendung von bereits hybridisierten Nylonmembranen, wurden radioaktive Oligonukleotid- und PCR-Sonden (s. Kap. 2.2.12) durch Inkubation in 0,1x SSC/0,1% SDS für 1h bei 70° C von den Membranen entfernt. Die erfolgreiche Entfernung der Sonden wurde durch Auflegen eines Imager-Screen und mittels des Phosphorimagers (Molecular Imager FX, Bio-Rad) überprüft. Northern-Membranen, welche mit einer RNA-Sonde hybridisiert wurden, konnten erst nach dem radioaktiven Zerfall der $\alpha^{32}\text{P}$ -Isotope erneut verwendet werden.

2.2.14 Quantitative Real-Time-PCR

Zum Vergleich der plastidären Transkriptmengen der *cp33a*- und *cp33b*-Mutanten mit denen von Wildtyp-Pflanzen wurde die quantitative RT-PCR verwendet. Gesamt-RNA wurde aus Pflanzenextrakten isoliert (s. Kap. 2.2.5) und mit Hilfe des *Clean & Concentrator*TM-5 Kit (Zymo Research) gereinigt und aufkonzentriert. Anschließend erfolgte die Umschreibung der RNA in cDNA durch die Verwendung der Superscript® III reversen Transkriptase (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers. Die qRT-PCR –Reaktionen wurden analog zu De Longevialle et al. (2008) durchgeführt. Hierfür wurden die cDNAs mit SYBR Green I Master Mix (Roche Applied Science) versetzt und mit einem LightCycler 480 Real-Time PCR System (Roche Applied Science) amplifiziert (verwendete Primerpaare s. Anhang, Tabelle 11 und Tabelle 12). Die Kerngene ACT (At1g49240, At3g18780) dienten zur Normalisierung der Daten. Die relativen Transkriptmengen wurden aus zwei (CP33A qRT-PCR) bzw. drei (CP33B qRT-PCR) biologischen Replikaten mit jeweils drei technischen Replikaten pro Genotyp berechnet.

2.2.15 Edierungsanalysen

Gesamt-RNA wurde aus Wildtyp und *cp33b-4* Pflanzen isoliert (2.2.5) und mit TURBOTM DNase (Thermo Scientific) nach Herstellerangaben verwendet, gefolgt von einer erneuten Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanol-Fällung (Sambrook und Russel 2001). Anschließend wurde die RNA durch reverse Transkription mittels der Superscript® III reversen Transkriptase (Invitrogen) in cDNA umgewandelt, ebenfalls den Angaben des

Herstellers folgend. Dabei wurden größtenteils Random-Primers, Oligodesoxyribonukleotide mit zufälliger Sequenz (Hexa/Nonamers 10ng) und zum Teil genspezifische Primer (2pmol, Primersequenzen s. Tabelle 3) verwendet. cDNA-Abschnitte, welche eine bzw. mehrere Edierungsstellen enthielten, wurden per PCR (Kap. 2.2.8) amplifiziert (Primersequenzen im Anhang, Tabelle 3). PCR-Produkte wurden mit Hilfe des GeneJET PCR *Purification* Kit (Thermo Scientific) aufgereinigt und anschließend sequenziert (Services in Molecular Biology).

2.2.16 Isolation und Fraktionierung von Chloroplasten

Arabidopsis-Pflanzen die zur Chloroplastenisolation benutzt wurden, wuchsen 14 Tage unter Standardbedingungen in Petrischalen auf einem Nylon-Netz (Maschengröße 0,3mm; Nybolt PA-200/54; Franz Eckert GmbH). Die Gewinnung der Chloroplasten erfolgte entsprechend den Protokollen von Kunst (1998) und Kupsch et al. (2012). In beiden Protokollen wurde ein Percollgradient (40%/80%) zur Trennung von intakten und kaputten Chloroplasten verwendet. Zur Beschleunigung des experimentellen Ablaufs, wurde in dieser Arbeit teilweise kein Percollgradient benutzt. In diesem Fall wurde das Pellet, welches nach der Homogenisierung des Pflanzenmaterials in einem Standmixer mit anschließender Zentrifugation (6min, 500 x g, Sorvall® RC 6) entstand, direkt weiter verwendet. Es enthielt neben Zellfragmenten, auch kaputte und intakte Chloroplasten. Der Aufschluss der Chloroplasten erfolgte in Extraktionspuffer (ca. 200µl pro 3 Petrischalen Ausgangsmaterial), indem die Chloroplasten 40 bis 50 mal durch eine Kanüle (0.4mm x 20mm) gezogen wurden. Membranen und Stroma wurden durch Zentrifugation (21.000 x g, 4°C, 30min) voneinander separiert. Der Proteingehalt des Stromas wurde mit dem Bio-Rad Protein Assay nach Herstellerangaben photometrisch (Lambda 35 UV/Vis Spektrometer; Perkin Elmer) bestimmt. Zur Weiterverwendung der plastidären Membranen, wurden diese 4 bis 5mal in Extraktionspuffer gewaschen und anschließend in diesem resuspendiert. Die Lagerung von Stroma und Membran-Fractionen erfolgte in 10% (v/v) Glycerol bei -80°C.

Innerhalb der Lokalisationsstudien von CP33A und CP33B wurde ein Teil der Membran-Fractionen nach dem Waschen mit 0,5% Natriumdeoxycholat für 5min auf Eis solubilisiert.

Extraktions-Puffer: 2mM DTT, 200mM KOAc, 30mM HEPES (pH 8,0 mit KOH), 10mM MgOAc, 1x Proteinase Inhibitor Cocktail, EDTA-frei (Roche)

2.2.17 Ko-Immunopräzipitationen

2.2.17.1 Ko-Immunopräzipitation aus Stroma und Membranfraktionen und RNA-Isolation

Die Immunopräzipitationen von CP33A und CP33B erfolgten hauptsächlich aus Stroma mit einer Proteinmenge zwischen 200 bis 600µg. Im Fall der Immunopräzipitationen von CP33B aus Chloroplastenmembranen, wurden diese zuvor mit 1% NP-40 (Nonidet™ P-40) für 15min auf Eis solubilisiert und zentrifugiert (10min, 20.000 x g, 4°C). Stroma bzw. gelöste Membranen wurden mit 1 Vol. CoIP-Puffer verdünnt und mit affinitätsaufgereinigten Antikörpern (3µl anti-CP33A-b und 10µl anti-CP33B) versetzt. Als Kontrollen dienten entweder die Präimmunsereen der jeweiligen Antikörper (3 bzw. 10µl, äquivalent zu den Antikörpermengen), 3µl aufgereinigtes Immunglobulin (*purified rabbit IgG*; NEB) bzw. im Fall der CP33B-IP wurde zum Teil Stroma der Knockout-Linie *cp33b-4* verwendet. Nachdem die Stroma/Antikörper-Mischung für 1h bei 4°C auf einem Überkopfschüttler (12 rpm) rotierte, erfolgte die Zugabe von 25µl magnetischen Kügelchen (SiMAG-ProteinG, chemicell) und die erneute Rotation für 1h bei 4°C. Anschließend wurden die Magnetkügelchen, welche sowohl das immunopräzipitierte Protein als auch die gebundene RNA enthielten, magnetisch vom Überstand getrennt. Das Präzipitat wurde dreimal in 500µl CoIP-Puffer gewaschen.

Zur Isolation der RNA aus Überstand und Präzipitat wurden beide Fraktionen mit 1% SDS, 5mM EDTA und 7,5µg/µl GlycoBlue™ *Coprecipitant* (Invitrogen) versetzt und 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Dadurch kam es zur Dissoziation der RNA-Protein-Komplexe. Es folgte eine Standard Phenol-Chloroform-Extraktion mit anschließender Ethanol-Präzipitation (Sambrook und Russel 2001).

CoIP-Puffer: 150mM NaCl, 20mM Tris-HCl (pH 7,5), 1mM EDTA, 2mM MgCl₂, 0,5% (v/v) Nonidet™ P-40, 5µg/ml Aprotinin

2.2.17.2 Ko-Immunopräzipitation aus Pflanzenextrakten und RNA-Isolation

Zur Untersuchung der Bindung von CP33A an freigesetzte mRNAs, welche nach der Dissoziation von Polysomen entstehen, wurde vor der Ko-Immunopräzipitation das Antibiotikum Puromycin verwendet. Puromycin verursacht die verfrühte Termination der

Translation, wodurch es zur Freisetzung von Ribosomen-gebundenen mRNAs kommt. Zunächst wurde Gesamtpflanzen-Material von 14-Tage alten Pflanzen in eiskalten Stickstoff und Polysomenpuffer (ca. 0,65ml pro 1g Pflanzenmaterial) mit Pistill und Mörser homogenisiert. Anschließend erfolgte per Zentrifugation (3min, 20000 x g) die Abtrennung des groben Zellmaterials. Da bei einer 0,5M KCL Konzentration die Dissoziation der Ribosomen durch Puromycin am höchsten ist (Smith und Gordon 1974), wurde das homogenisierte Pflanzenmaterial mit 7% (v/v) 4M KCL versetzt. Das Homogenisat wurde anschließend in zwei Teile aufgeteilt, wobei ein Anteil mit Puromycin (0,5mg/ml) vermischt wurde. Beide Ansätze wurden für 10min bei 37°C inkubiert.

Die anschließende Immunopräzipitation von CP33A aus beiden Fraktionen (mit und ohne Puromycin), wurde wie zuvor beschrieben durchgeführt (Kap. 2.2.17.1). Als Kontrolle diente die Immunopräzipitation mit aufgereinigtem Immunglobulin (*rabbit IgG*, NEB) auf lysiertes Pflanzenmaterial ohne Puromycin.

Die RNA-Isolation aus Überstand und Präzipitat erfolgte mittels des TRIzol® Reagenz (Life Technologies) nach Angaben des Herstellers. Die RNA wurde in TE-Puffer aufgenommen und mit Hilfe des RNA *Clean & Concentrator*™-5 Kit (Zymo Research) gereinigt und aufkonzentriert. Anschließend wurde zur Überprüfung auf DNA-Kontaminationen sowohl die Konzentration an RNA als auch an DNA mittels des Qubit® RNA HS Assay Kit bzw. Qubit® dsDNA HS Assay Kit bestimmt.

Polysomenpuffer: 200mM Tris-HCl (pH 9), 200mM KCl, 35mM MgCl₂,
25mM EGTA, 0,2M Saccharose, 1% (v/v) TritonX-100,
2% (v/v) Polyoxyethylene-10Tridecylether
Frisch dazu: 1x Proteinase-Inhibitor Cocktail (Roche),
Heparin 0,5mg/ml,

2.2.18 RIP-Chip-Analysen

Innerhalb der RIP-(RNA-Immunopräzipitations)-Chip-Analysen wurde die kopräzipitierte RNA von CP33A bzw. CP33B auf selbst hergestellten *Microarrays* hybridisiert. Für die Kopräzipitationen wurden entweder Stroma, Membranfraktionen (s. Kap. 2.2.17.1) bzw. Gesamtpflanzenextrakte (s. Kap. 2.2.17.2) verwendet und deren Erfolg mittels einer Western-Analyse (s. Kap. 2.2.21) überprüft. Anschließend konnten die, von den cpRNPs gebundenen RNAs isoliert werden (s. Kap. 2.2.17.1 und 2.2.17.2).

2.2.18.1 *Microarray* Herstellung

Sowohl der Plastom überspannende *Microarray* (*tiling array*) als auch der Oligonukleotid-*Microarray* wurden wie zuvor beschrieben hergestellt (Kupsch et al. 2012). Bis auf wenige Lücken decken 500-1000 nt lange PCR-Produkte das gesamte Chloroplastengenom des *tiling arrays* ab (Primersequenzen zur Herstellung der PCR-Produkte im Anhang, Tabelle 8). Dagegen wurden im Oligonukleotid-*Microarray* nur einige ausgewählte plastidäre RNAs mit einem bzw. mehreren 50 nt langen Oligonukleotiden abgedeckt (Oligonukleotidsequenzen im Anhang, Tabelle 9).

2.2.18.2 Fluoreszenzmarkierung und *Microarray*-Hybridisierung

Sowohl die Fluoreszenzmarkierung als auch die Hybridisierung auf einem *tiling* bzw. Oligonukleotid-Array erfolgte wie beschrieben in Kupsch et al. 2012. Die gesamte RNA-Menge des Präzipitats (ca. 50-300ng) und 1 bis 2µg der Überstand-RNAs, von jeweils Experiment und Kontrolle, wurden mit 0,5µl Cy5 bzw. 1µl Cy3 fluoreszenzmarkiert (ULS™ *aRNA labeling Kit*; KREATECH Diagnostics).

2.2.18.3 Auswertung des *Microarrays*

Mit Hilfe der GenePix 6.0 Software (Molecular Devices) erfolgte die Auswertung der *Microarrays*. Spots mit sehr niedrigen Fluoreszenzintensitäten wurden von der Software automatisch ausgeschlossen. Von den 12 technischen Replikaten jedes PCR-Produkts/Oligonukleotides mussten mindestens 6 Spots eine Fluoreszenzintensität über dem Hintergrund aufweisen, um in der Auswertung enthalten zu sein. Die Software bildete aus den 6-12 Replikaten den Medianwert, sowohl für Cy3 und Cy5 (F635 Median und F532 Median). Zusätzlich wurde das Cy5/Cy3 (Präzipitat/Überstand) Verhältnis für jeden Spot und anschließend der Medianwert berechnet (Median(*Median of Ratios* (635/532))).

In den graphischen Darstellungen wurden entweder die Präzipitat/Überstand Verhältnisse von Experiment und Kontrolle getrennt dargestellt bzw. deren Quotient. Die Normalisierung der Daten des Plastom überspannenden *Microarrays* erfolgte auf die Summe der F532-Median-Werte der ribosomalen RNAs, da diese keine Ziele der cpRNPs darstellen (Kupsch et al. 2012). Die Daten des Oligonukleotid-*Microarrays* wurden auf die gesamte Summe der F532-Median-Werte mit Ausnahme der Werte für *psbA* normalisiert (s. Kap. 3.7.1).

2.2.19 *In-vitro* RNA-Bindestudien

2.2.19.1 RNA-Fragmentierung

Gesamt-RNA aus Chloroplasten wurde wie beschrieben (s. Kap. 2.2.5) isoliert. Anschließend erfolgte die Fragmentierung der RNA (1 bis 4µg) durch chemische Lyse in ¼ Vol. Fragmentierungspuffer, für 5min bei 95°C. Zum Beenden der Fragmentierung wurde 1 Vol. eiskalter TE-Puffer zugegeben und 5min auf Eis inkubiert. Als Kontrolle diente der gleiche Ansatz ohne Inkubation bei 95°C für 5min, sowie ein Ansatz ohne Fragmentierungspuffer. Die RNA wurde durch Zugabe von 2,5 Vol. 96% Ethanol und 10% (v/v) 3M Natriumacetat (pH 5,2) gefällt (Sambrook und Russell 2001), mit 70% Ethanol gewaschen und anschließend in *A. bidest* resuspendiert.

Fragmentierungspuffer: 100mM KOAc, 30mM MgOAc, 200mM Tris-HCl
(pH 8,1)

2.2.19.2 *In vitro* RNA-Bindung und Immunopräzipitation

Zur Untersuchung der *in vitro* Bindung von CP33B an plastidäre RNAs, wurde rekombinantes CP33B und als Kontrolle MBP (*maltose binding protein*) verwendet, welche zuvor von Tea Kecman exprimiert und aufgereinigt wurden (Masterarbeit Tea Kecman 2013). Die rekombinanten Proteine (CP33B: 20 bzw. 50nm, MBP: 50nm) wurden mit je 1µg drei verschiedener RNA-Fraktionen (unbehandelte RNA, fragmentierte RNA (s. Kap. 2.2.19.1) und RNA mit Fragmentierungspuffer aber ohne Hitzeeinwirkung) in 1/5 Vol. 5x BAB für 30min bei 25°C auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Ein Ansatz hatte ein Mindestvolumen von 200µl. Nach Zugabe von 1 Vol. CoIP-Puffer erfolgte die Immunopräzipitation mit anschließender RNA-Isolation wie beschrieben in Kap. 2.2.17.1. Die RNAs wurden auf eine Nylonmembran geblottet (s. Kap. 2.2.11) und mit radioaktiv markierten Oligonukleotid-Sonden hybridisiert (s. Kap. 2.2.13).

5x BAB (*Binding Assay Buffer*): 750mM NaCl, 250mM Tris-HCL (pH 7,5), 20mM DTT,
50% (v/v) Glycerol, 0,2mg/ml BSA, frisch dazu:
0,5mg/ml Heparin

2.2.20 Proteinisolation und Quantifizierung

Arabidopsis-Pflanzenmaterial wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und entweder in einer Schwingmühle (2x 30s, 30Hz; Mixer Mill 400; RETSCH®) oder per Pistill und Mörser in Proteinisolationpuffer (50 - 100µl pro 100mg Frischgewicht) homogenisiert. Optional wurden anschließend lösliche und unlösliche Bestandteile voneinander durch 10-minütige Zentrifugation (21.000 x g, 4°C) getrennt. Wobei dem Proteinisolationpuffer im Vorhinein 1% NP-40 zugesetzt wurde. Die unlösliche Pelletfraktion wurde in Proteinisolationpuffer resuspendiert. Die Konzentrationen der Proteinlösungen wurden mit dem Bio-Rad Protein Assay nach Herstellerangaben photometrisch (Lambda 35 UV/Vis Spektrometer; Perkin Elmer) bestimmt.

Proteinisolationpuffer: 10% (w/v) Saccharose, 100mM Tris-HCL (pH 7,2), 5mM EDTA, 5mM EGTA, 10µM Aprotinin, 2mM PMSF, 2,5mM DTT, Optional :1% (v/v) Nonidet™ P-40

2.2.21 Western-Analysen

2.2.21.1 Denaturierende Protein-Gelelektrophorese

Proteinproben wurden mit 0,5 Vol. 3x Proteinladepuffer versetzt und für 15min bei 65°C denaturiert. Anschließend erfolgte die Beladung auf einem SDS-Polyacrylamidgel (5%iges Sammelgel und 13%iges Trenngel) neben einem Mengenstandard (PageRuler™ *Prestained Protein Ladder*, Fermentas). Die Elektrophorese lief nach den Prinzipien von Laemmli (1970) ab, bei 60-150V in 1x SDS-Laufpuffer (Mini-Protean-III™ Systems (Bio-Rad)).

3x Proteinladepuffer: 30% (v/v) Glycerol, 15% (v/v) β-Mercaptoethanol, 7% (w/v) SDS, 200mM Tris-HCl (pH 6,8), 0,1% (w/v) Bromphenolblau

Sammelgel: 5% (v/v) Acrylamid, 130mM Tris-HCl (pH 6,8), 0,1% (w/v) SDS, 0,1% (w/v) APS, 0,1% (v/v) TEMED

Trenngel: 13% (v/v) Acrylamid, 375mM Tris-HCl (pH 8,8), 0,1% (w/v) SDS, 0,1% (w/v) APS, 0,05% (v/v) TEMED

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

2.2.21.2 Membrantransfer und Immunodetektion

Die auf SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennten Proteine (s. Kap. 2.2.21.1) wurden in einem „Mini Trans-Blot“® Cell System (Bio-Rad) in 1x Transferpuffer entweder über Nacht (35V) oder für 1h (100V) auf Nitrozellulosemembranen (Hybond-C Extra, GE Healthcare) geblottet. Danach wurden die Membranen mit Ponceau S gefärbt, mit Wasser gewaschen und eingescannt.

Zur Vorbereitung der Immunodetektion wurden die Membranen für mind. 30 Minuten in einer 4%igen Milchpulverlösung blockiert. Sowohl die primären als auch die sekundären Antikörper wurden in 2% Milchpulverlösungen in 1x TBST verdünnt (Übersicht der Antikörper und deren Verdünnungen s. Anhang, Tabelle 4) und für 1h mit den Membranen inkubiert. Nach der Inkubation mit dem 1. und dem 2. Antikörper wurde jeweils 3x 10 Minuten mit 1x TBST gewaschen. Die Detektion erfolgte nach dem Prinzip der Chemilumineszenz entweder auf Röntgenfilmen (Hyperfilm™ MP, Amersham Biosciences) oder in einem Chemidoc XRS+ Imager (Bio-Rad). Die Quantifizierung der Immunoblots war mittels der Imager und Quantity-One Software (Bio-Rad) möglich.

<u>1x Transferpuffer:</u>	25mM Tris, 200mM Glycin, 20% (v/v) MeOH
<u>1x Ponceaulösung:</u>	3% (w/v) Trichloressigsäure, 3% (w/v) 5-Sulfosalicylsäure, 0,2% (w/v) Ponceau S (Merck)
<u>10x TBST:</u>	0,5M Tris-HCl (pH 7,5), 1,5M NaCl, 1% (v/v) Tween®20
<u>Blockierungslösung:</u>	4% (w/v) Trockenmilch (SIGMA), in 1x TBST
<u>Chemilumineszenz-Lösung:</u>	50mM Tris-HCl (pH 8,5), 0,01% (v/v) H ₂ O ₂ , 1,25mM Luminol in DMSO, 0,45mM p-Cumarsäure in DMSO

2.2.22 Polysomenanalyse

Polysomen wurden aus 400mg 14-Tage alter Arabidopsis-Pflanzen präpariert. Das Pflanzengewebe wurde in 1ml Polysomenpuffer zerkleinert und in Saccharose-Gradienten (15-55%) größenfraktioniert, so wie beschrieben in Barkan (1993). Es wurden insgesamt 12 Fraktionen abgenommen und jeweils für anschließende RNA und Protein-Nachweise halbiert.

Material und Methoden

Bevor die RNA durch phenolische Extraktion isoliert werden konnte, wurden die RNA-Proteinkomplexe durch die Zugabe von 0,5% (w/v) SDS und 20mM EDTA dissoziiert. Die RNA-Proben wurden in Northern-Analysen (s. Kap. 2.2.10) weiter untersucht. Die Proteinproben wurden auf SDS-Gelen aufgetragen und durch Immunodetektion analysiert (s. Kap. 2.2.21).

Polysomenpuffer: 200mM Tris-HCl (pH 9), 200mM KCl, 35mM MgCl₂, 25mM EGTA, 0,2M Saccharose, 1% (v/v) TritonX-100, 2% (v/v) Polyoxyethylene-10-Tridecylether, Frisch dazu: Heparin 0,5mg/ml, 100mM β-Mercaptoethanol, 100µg/ml Chloramphenicol, 25µg/ml Cycloheximid

2.2.23 Lokalisationsstudien mittels Fluoreszenzmikroskopie

Zur Lokalisierung von CP33A und CP33B mittels Fluoreszenzmikroskopie wurden zunächst GFP- (*green fluorescent protein*) Konstrukte hergestellt. Dafür wurde cDNA aus Gesamt-RNA von Wildtyppflanzen, wie in Kap. 2.2.15 beschrieben, mit Hilfe der Superscript® III reversen Transkriptase (Invitrogen) synthetisiert. Die kompletten cDNA-Sequenzen von CP33A und CP33B wurden in PCR-Reaktionen amplifiziert (Primersequenzen s. Tabelle 3, Anhang) und in einen Vektor (pOL-GFP S65C, Peeters et al. 2000) integriert. Der Vektor enthält die kodierende Sequenz für GFP und einen 35S Promoter. Sowohl PCR-Produkte als auch Vektor wurden zuvor mittels XhoI und NcoI Restriktionsenzymen geschnitten und anschließend mit Hilfe einer DNA-T4-Ligase (5 U/µl) ligiert. Der Ligationsansatz wurde zu einem Aliquot chemisch kompetenter TOP10 *E.coli*-Zellen hinzugefügt und für 30min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für 1min bei 42°C. Anschließend konnten sich die Zellen in LB-Medium bei 37°C in einem Schüttler (220rpm) erholen, bevor sie auf LB-Selektivmedium (100µg/ml Carbenicillin) ausplattiert wurden. Die erfolgreichen und korrekten Insertionen wurden durch PCR-Reaktionen (s. Kap. 2.2.8) und Sequenzierungen verifiziert und nachfolgend mittels einer Midi-Plasmidpräparation isoliert. Dafür wurden transformierte *E.coli*-Zellen in 150 – 200ml LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika über Nacht bei 37°C und 220 rpm angezogen. Unter Verwendung des QIAGEN® Plasmid-Midi-Kit erfolgte die Präparation von Plasmid-DNA durch alkalische Lyse laut Herstellerangaben. Das PEND-dsRED Konstrukt steht unter der konstitutiven Kontrolle eines Ubiquitin-Promotors (pUbi) und wurde von Mitarbeitern der AG Kirsten Krause kloniert. Die

Transfektion der CP33A/CP33B-GFP und PEND-dsRED Fusionskonstrukte erfolgte wie zuvor beschrieben (Fuss et al. 2013). Es wurden *Arabidopsis thaliana* Mesophyll-Zellen einer Suspensionskultur in MS-Medium verwendet. Die transfizierten Zellen wurden durch ein Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop (Zeiss LSM 510 META) und der ZEISS LSM IMAGE BROWSER Software untersucht, ebenfalls durchgeführt von Mitarbeitern der AG Kirsten Krause.

LB-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 3,5% (w/v) LB-Agar (Sigma)

3. Ergebnisse

3.1 CP33A und CP33B lokalisieren hauptsächlich im Stroma

Die beiden kernkodierte chloroplastidären Ribonukleoproteine (cpRNPs) CP33A und CP33B aus *Arabidopsis thaliana* weisen einen charakteristischen Aufbau eines cpRNPs auf und besitzen neben einem N-terminalen Chloroplasten-Importsignal (Transit-Peptid), eine kurze saure Domäne sowie zwei RRM (RNA recognition motif)-Domänen (Abb. 2). Vorhersage-Algorithmen wie z.B. Predotar und TargetP prognostizieren für CP33A und CP33B eine Lokalisation in den Chloroplasten (Ruwe et al 2011).

Um eine chloroplastidäre Anreicherung von CP33A und CP33B *in vivo* zu bestätigen, wurden an Zellfraktionierungen gekoppelte Western-Analysen durchgeführt. Hierfür wurden Chloroplasten aus 14 Tage alten Wildtyp-Pflanzen isoliert und in Membranen und lösliche Proteine (= Stroma) aufgetrennt. Die Membranen wurden mehrmals gewaschen und ein Teil mittels des anionischen Detergenz Natriumdeoxycholat (0,5%) solubilisiert (Abb. 4A). Von jeder Fraktion wurden gleiche Volumenanteile durch SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt. Als Membranmarker dient ein PsaD-Antikörper, der eine periphere Untereinheit des Photosystem I nachweist (Chitnis 1996). Es wird kein Signal für PsaD in den Stromafraktionen, ein starkes Signal in den Membranen und nur ein sehr schwaches in den solubilisierten Membranen detektiert. Somit werden durch die Solubilisierung keine peripheren Membranproteine, wie PsaD, gelöst. Die Detektion von RbcL, der großen Untereinheit der im Stroma befindlichen Ribulose-1,5-Bisphosphat Carboxylase/Dehydrogenase (RuBisCO), dient als Marker für die Stromafraktion. Da in den Membranfraktionen noch ein schwaches Signal für RbcL nachweisbar ist, wurde eine weitere Western-Analyse auf die gleichen Fraktionen mit einem Antikörper gegen die Glutamat-1-Semialdehyd-Aminotransferase (GSAT), einem im Stroma lokalisierten Enzym der Chlorophyll-Biosynthese (Eckhardt et al. 2004) durchgeführt. Es kann kein Signal für GSAT in den Membranen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Demzufolge war die Fraktionierung in Stroma und Membranen erfolgreich. Die Western-Analysen belegen, dass der größte Anteil von CP33A (35,7 kDa) und CP33B (33,8 kDa) im Stroma zu finden ist. Nur ein Bruchteil von CP33A ist in Membranen detektierbar, wohingegen ein erheblicher Anteil von CP33B auch in den Membranen nachweisbar ist (Abb. 4). Nach der Quantifizierung der CP33B Signale mit Hilfe der Image Lab Software (Bio-Rad), befindet sich etwa 75% des Proteinpools von CP33B im Stroma und etwa ein Viertel in der Membranfraktion. Da sich

CP33B mit dem milden Detergenz Natriumdeoxycholat leicht aus den Membranfraktionen lösen lässt, ist der membrangebundene Teil von CP33B nicht in die Membranen integriert, sondern voraussichtlich peripher, oder indirekt, z.B. über eine RNA oder andere Interaktionspartner an die Membranen gebunden. Integrale Membranproteine weisen keine Lokalisation außerhalb der Membranen auf. Zusätzlich werden anhand der Proteinsequenzen von CP33B und auch CP33A keine Transmembrandomänen vorhergesagt, siehe ein Vergleich mehrerer Vorhersageprogramme innerhalb der Datenbank Aramemnon (Schwacke et al. 2003, <http://aramemnon.uni-koeln.de/index.ep>).

Insgesamt lokalisiert der größte Anteil von CP33A und CP33B im Stroma und bestätigt damit *in vivo* Studien der Tabak cpRNPs und von CP29A aus Arabidopsis, welche ebenfalls das Stroma als Hauptbestimmungsort identifizierten (Nakamura et al. 1999, Raab et al. 2006).

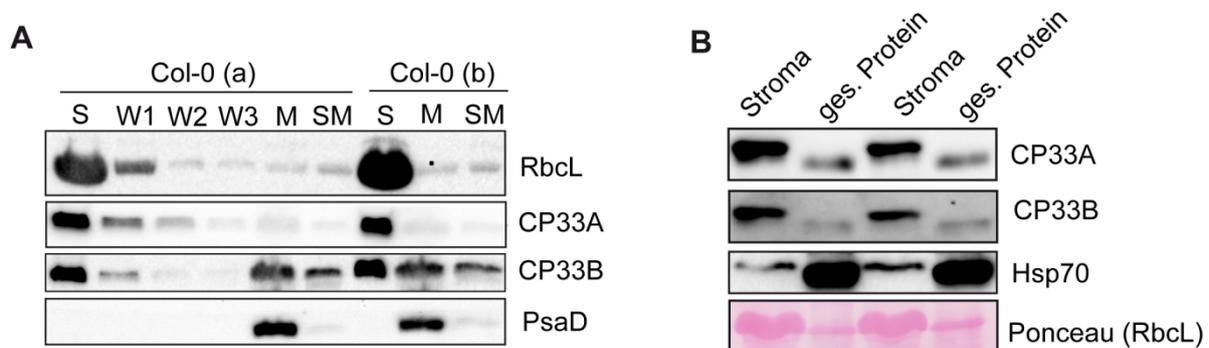


Abb. 4: CP33A und CP33B lokalisieren hauptsächlich im Stroma

(A) Chloroplasten zweier Wildtyp-Replikate (Col-0 a und b) wurden in Stroma (S) und Membranen (M) separiert. Membranen wurden 4-5mal gewaschen und mit 0,5% Natriumdeoxycholat solubilisiert (SM). Von jeder Fraktion, inklusive der ersten drei Waschschrte (W1, W2, W3) von Col-0 (a), wurden gleiche Volumenanteile durch SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Neben dem immunologischen Nachweis von CP33A (Antikörper Peptid a) und CP33B, dienen Antikörper für RbcL (große Untereinheit von RuBisCO (Ribulose-1,5-Bisphosphat Carboxylase/Dehydrogenase)) und PsaD (Untereinheit von Photosystem I) als Stroma- bzw. Membranmarker. (B) Gleiche Proteinmengen von Stroma und Gesamtproteinextrakten von zwei verschiedenen Wildtyp-Präparaten wurden immunologisch analysiert. Nach der Auftrennung durch eine PAGE erfolgte der Nachweis von CP33A und CP33B. Der Ausschnitt von RbcL in der Ponceaufärbung verdeutlicht die Anreicherung im Stroma, wogegen das cytosolische Hsp70 in der Gesamtproteinfraktion angereichert ist.

In einigen Veröffentlichungen wird über eine zusätzliche Funktion der cpRNPs außerhalb der Chloroplasten spekuliert (Gosai et al. 2015, zusammengefasst in Ruwe et al. 2011). Zusätzlich konnte Janina Fuss einige Mitglieder der cpRNPs aus Arabidopsis (CP28A, CP29B, CP31A und CP31B) durch Fluoreszenzmikroskopie-Studien, neben den Chloroplasten, auch im Zellkern und im Cytoplasma identifizieren (Doktorarbeit Janina Fuss 2012). In dieser Studie wurden gleiche Proteinmengen vom Stroma und Gesamtproteinextrakten nebeneinander durch SDS-PAGE aufgetrennt und CP33A und CP33B immunologisch detektiert (Abb. 4B).

Die Verwendung eines cytoplasmatischen Hsp70-Antikörpers (Hitzeschockprotein 70) und die große Untereinheit von RuBisCO (dargestellt durch eine Ponceaufärbung) dienen als Kontrolle für die Anreicherung in der jeweiligen Fraktion. Damit sind CP33A und CP33B deutlich in der Stromafraktion gegenüber den Gesamtproteinextrakten angereichert. Eine Lokalisation beider cpRNPs außerhalb der Chloroplasten ist dennoch nicht auszuschließen, wäre aber im geringen Maße.

3.1.1 CP33A und CP33B kolokalisieren nicht mit Nukleoiden

Die Stroma Lokalisierung von CP33A konnte zusätzlich mittels Fluoreszenzmikroskopie bestätigt werden (Teubner et al. 2017). Die Fluoreszenzsignale für CP33A waren neben einer diffusen Verteilung auch als konzentrierte, punktartige Aggregate, welche an Nukleole erinnerten, sichtbar. Um eine Kolokalisation mit Nukleoiden zu untersuchen, fand eine Kotransfektion von CP33A-GFP (Grün fluoreszierendes Protein) mit einem zweiten Vektor statt, welcher das PEND (*plastid envelope DNA binding*) Protein mit einem dsRed-Tag (Rot fluoreszierendes Protein) exprimiert. PEND bindet an plastidäre DNA und kann daher als Marker für Nukleole verwendet werden (Terasawa und Sata 2005). Es wurde keine Kolokalisation mit Nukleoiden festgestellt (Teubner et al. 2017).

Die gleichen Fluoreszenzmikroskopischen Lokalisationsstudien wurden auch für CP33B durchgeführt (in Kooperation mit der AG Kirsten Krause). Hierbei wurde CP33B mit einem GFP-Tag versehen und transient über einen Vektor in Protoplasten exprimiert. Das GFP-Fluoreszenzsignal ist hauptsächlich diffus in Chloroplasten verteilt, mit einer teilweisen Überlappung der Chlorophyll-Autofluoreszenz (Abb. 5C, F). Dies deutet auf eine Verteilung sowohl im Stroma als auch in den Thylakoiden hin und bestätigt damit die Western-Analysen (s. Abb. 4A). Zur Überprüfung einer Kolokalisation von CP33B mit Nukleoiden, wurde wie für CP33A, eine Kotransfektion mit einem Vektor, der PEND-dsRed-Tag exprimiert, durchgeführt. Die Fluoreszenz-Bilder zeigen keine oder nur geringe Überlappung des CP33B-GFP und des PEND-dsRed Signales (Abb. 5J, N), was eine Assoziation von CP33B mit Nukleoiden unwahrscheinlich macht. Ein möglicher Einfluss des Fluoreszenztags und des künstlichen Promotors auf die Lokalisierung der beiden cpRNP Proteine wurde nicht untersucht. Die Ergebnisse für CP33A und CP33B sind dennoch glaubwürdig, da bei gleicher experimenteller Durchführung für ein anderes Protein (EF-Tu), eine partielle Überlappung mit dem PEND-Signal beobachtet werden konnte (Dissertation Janina Fuss). Dieses Resultat bestätigt Untersuchungen in Maispflanzen. In diesen wurden Homologe der beiden cpRNPs CP33A und CP33B lediglich als Kontaminationen im Nukleoid gefunden, wohingegen

zahlreiche andere RNA-Bindeproteine, mit einer Funktion innerhalb des plastidären RNA-Metabolismus, im Nukleoid nachgewiesen werden konnten (Majeran et al. 2012). Letztendlich sind CP33A und CP33B damit nicht am RNA-Metabolismus innerhalb der Nukleole reifer Arabidopsis-Chloroplasten beteiligt.

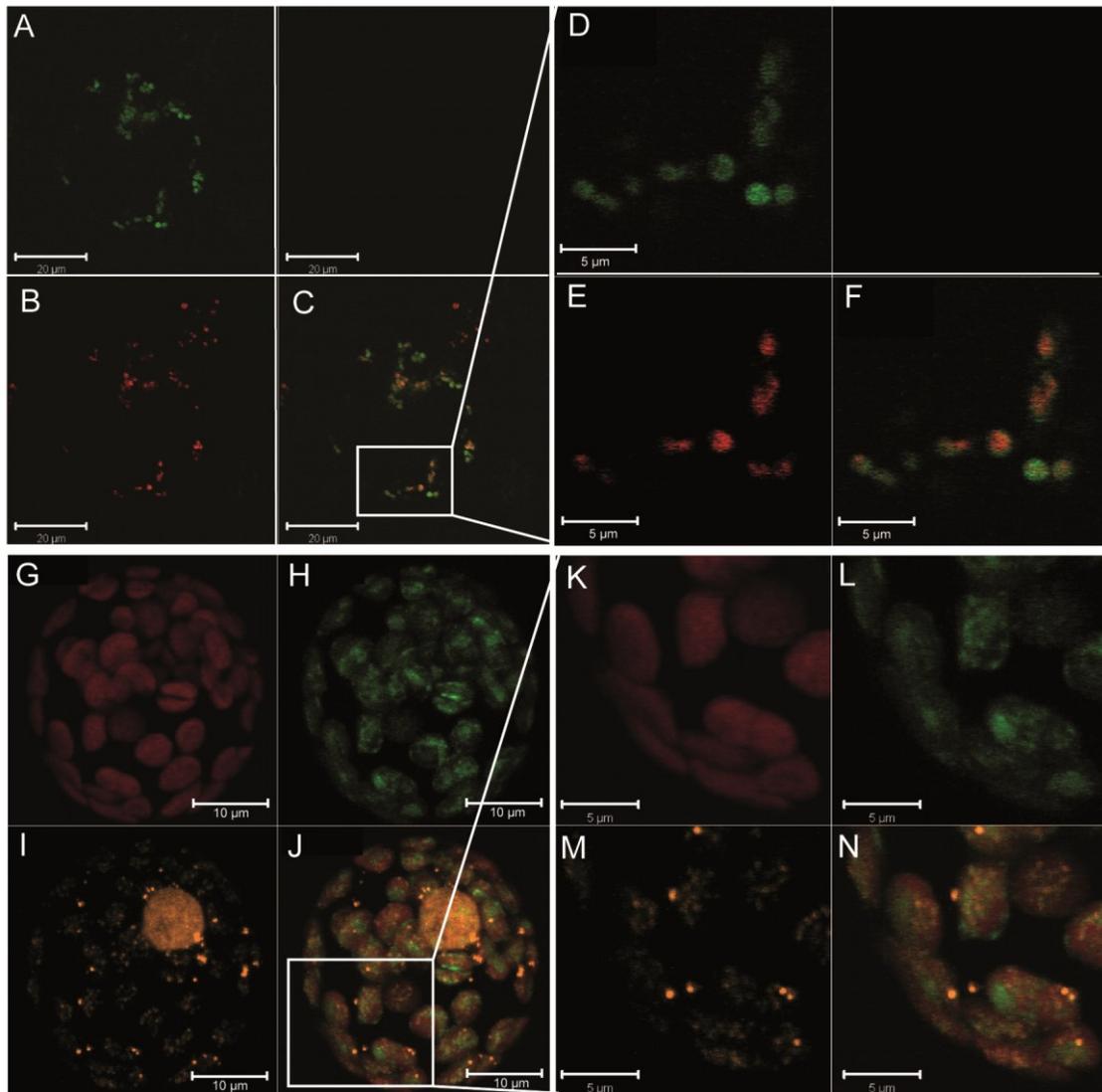


Abb. 5: CP33B Lokalisation innerhalb des Chloroplasten

A-F: Bilder von CP33B-GFP transformierten Zellen. D, E und F sind Vergrößerungen des Bereiches der weißen Box von jeweils A, B und C. GFP Fluoreszenz (A und D, grün); Chlorophyll Autofluoreszenz (B und E, rot); Überlagerung der Bilder A und B (in C) bzw. D und E (in F). G-N: Bilder der Ko-Transfektion von CP33B-GFP und PEND-dsRed. K-N sind Vergrößerungen des Bereiches der weißen Box von G-J. Chlorophyll Autofluoreszenz (G und K, rot); GFP Fluoreszenz (H und L, grün); dsRed Fluoreszenz (I und M, Orange); Überlagerung der Bilder G-I (in J) bzw. K-M (in N). Die weißen Balken repräsentieren 20 μm, 10 μm bzw. 5 μm als Größenverhältnisse. Alle Fluoreszenzmikroskopie Bilder wurden von Janina Fuß (AG Kirsten Krause) angefertigt.

3.2 CP33A und CP33B interagieren mit multiplen plastidären RNAs

3.2.1 Ko-Immunopräzipitationen mit spezifischen Antikörpern

Die Mitglieder der cpRNP-Familie sind in der Lage mit multiplen RNAs zu assoziieren, so bereits in einigen *in-vitro* (Li und Sugiura, 1991, Ye und Sugiura 1992, Lisitsky et al. 1994, Lisitsky et al. 1995) und *in-vivo* Studien (Nakamura et al. 1999; Kupsch et al. 2012) belegt. Um die chloroplastidären RNA-Liganden von CP33A und CP33B zu untersuchen, wurde die RIP-Chip-Technik verwendet. In einem RIP-Chip-Experiment wird ein spezifisches RNA-Bindeprotein präzipitiert und anschließend die an das cpRNP gebundene RNA isoliert, fluoreszenzmarkiert und auf einem *Microarray* hybridisiert. Aufgrund der beobachteten Hauptlokalisierung von CP33A und CP33B im Stroma (s. Kap. 3.1) wurden Stroma-Extrakte für die Immunopräzipitationen (IP) verwendet und deren Erfolg mittels einer Western-Analyse bestätigt. Als Kontrollen dienen entweder Präzipitationen mit den entsprechenden Präimmunsereen auf Wildtyp-Stroma (Abb. 6A,B) bzw. für die CP33B-IP teilweise Stroma-Extrakte von *cp33b*-Nullmutanten (Abb. 6C). Die IP von CP33A ist äußerst effizient. Der Hauptteil des Proteins wird in der Präzipitat-Fraktion angereichert und nur sehr wenig CP33A kann noch im IP-Überstand detektiert werden (Abb. 6A). CP33B wird ebenfalls erfolgreich präzipitiert, wobei noch ein Anteil des Proteins im IP-Überstand nachweisbar ist (Abb. 6B).

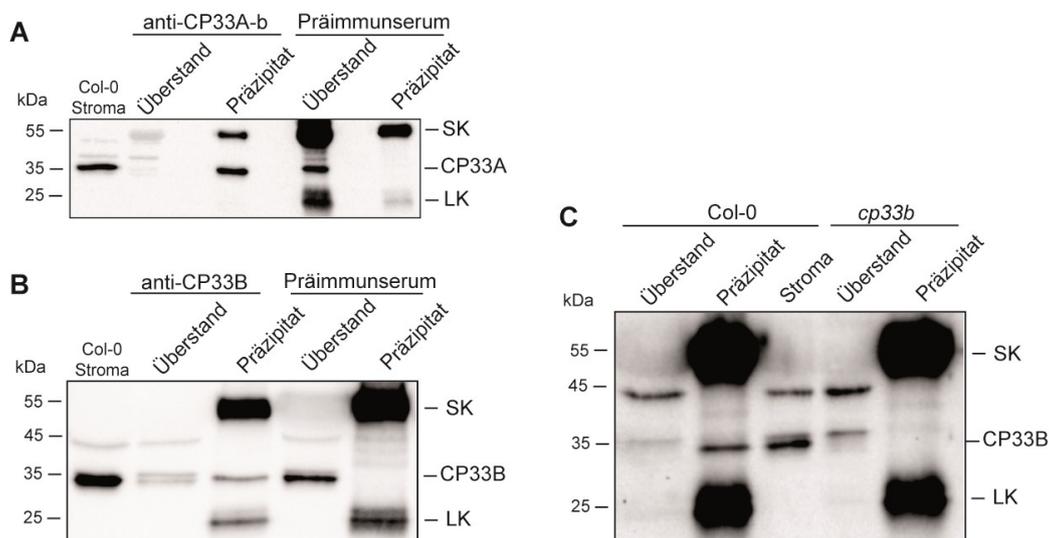


Abb. 6: Immunopräzipitation von CP33A und CP33B

Western-Analysen der Immunopräzipitations-Fractionen auf Wildtyp-Stroma mit (A) anti-CP33A (Antikörper b) und (B+C) anti-CP33B, sowie den entsprechenden Präimmunsereen (A+B). In (C) wurde für die CP33B-IP Stroma aus Wildtyp und als Kontrolle Stroma von *cp33b*-Nullmutanten verwendet. Jeweils ein Teil des Wildtyp-Stromas, welche für die IPs verwendet wurden, sowie 1/13 der Überstand-Faktionen und 1/8 (CP33A) bzw. 1/10 (CP33B) der Präzipitat-Faktionen wurden durch SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Banden markiert mit SK und LK repräsentieren die schweren bzw. leichten Ketten der für die Immunopräzipitation verwendeten Antikörper. Die Analysen wurden mehrmals mit demselben Ergebnis wiederholt.

3.2.2 CP33A interagiert mit der Mehrheit der plastidären mRNAs

Für die Hybridisierung auf dem Arabidopsis Chloroplasten *Microarray* wurden kopräzipitierte RNAs (Präzipitat-Fraktion) sowie freie ungebundene RNAs (Überstand-Fraktion) von jedem Immunopräzipitations-Experiment extrahiert und entweder mit roten (Cy5 für Präzipitat) oder grünen (Cy3 für Überstand) Fluoreszenzfarbstoffen chemisch markiert. Bei dem *Microarray* handelte es sich um einen *tiling-array*, welcher durch die Verwendung von überlappenden, ca. 500-1000 bp langen PCR-Produkten (Primersequenzen s. Anhang, Tabelle 8), das gesamte Chloroplasten-Genom von Arabidopsis abdeckt (Kupsch et al. 2012). Die Auswertung von jeweils drei biologischen Replikaten erfolgte mit Hilfe der GenePix 6.0 Software (Molecular Devices). Die ermittelten Präzipitat/Überstand-Quotienten der CP33A-IP und der Kontroll-IP (IP mit Präimmunserum) wurden ins Verhältnis gesetzt und anschließend in einem Diagramm gegen die entsprechende Position auf dem Chloroplastengenom dargestellt (Abb. 7).

Immunopräzipitationen mit anti-CP33A zeigen gegenüber der Kontrolle eine Anreicherung des Großteils des plastidären Transkriptom. Dabei scheinen gesamte Operons mit CP33A assoziiert zu sein, wie zum Beispiel das *atpI-H-F-A-*, das *psbD-C-*, das *psaA-psaB-rps14-*, das *psbE-F-L-J-* und das *ndhH-A-I-G-E-* Operon. Insgesamt gibt es nur wenige Regionen bzw. RNAs die nicht angereichert sind, dazu gehören rRNAs, viele tRNAs (z.B. *trnQ*, *trnH*, *trnC*, *trnS*, *trnfM*, *trnF*) und *rpl32*, die mRNA mit der geringsten Anreicherung (Daten in Teubner et al. 2017).

Um die RIP-Chip Experimente zu verifizieren und die Menge der gebundenen RNAs zu quantifizieren, wurden *Dot-Blot*-Analysen von ausgesuchten RNAs durchgeführt. Hierfür wurden gleiche RNA-Mengen von Präzipitat und Überstand der CP33A-IP und Kontroll-IP auf Nylonmembranen fixiert und anschließend mit radioaktiv markierten RNA-Sonden hybridisiert (Abb. 7B). Obwohl gleiche Mengen an Input-Material für die IPs verwendet wurden, zeigen die Überstand-Fraktionen vom Präimmunserum einen reduzierten RNA-Gehalt gegenüber den CP33A Überstand-Fraktionen. Eine mögliche Erklärung könnten RNase-Kontaminationen im Präimmunserum darstellen. Um einen Einfluss auf die RIP-Chip Experimente auszuschließen, wurden *Dot-Blot*-Analysen (Abb. 7B) und ein CP33A RIP-Chip mit aufgereinigtem Immunglobulin (IgG) als Kontrolle durchgeführt (Anhang Abb. 1). Im *Dot-Blot* war keine Reduktion der RNA in den Überständen nachweisbar. Ansonsten ähnelten die Ergebnisse mit IgG als Kontrolle (*Dot-Blot* und RIP-Chip) stark denen mit Präimmunserum als Kontrolle. Damit wird eine mögliche RNase-Kontamination im Präimmunserum bei der folgenden Auswertung vernachlässigt.

Alle in den *Dot-Blot*-Analysen untersuchten mRNAs weisen eine Anreicherung in den Präzipitat-Fractionen von CP33A gegenüber den Präzipitat-Fractionen der Kontrollen auf. Dabei kopräzipitiert mehr als die Hälfte des *psbF* und *rbcL* Transkriptes mit CP33A, was auf eine Interaktion von CP33A mit dem Hauptteil der im Stroma befindlichen *psbF* und *rbcL* mRNAs deuten lässt. Im RIP-Chip zeigt *psbA* eine geringe Anreicherung und auch im *Dot-Blot* akkumuliert *psbA* am wenigsten im Präzipitat. Als Negativkontrollen dienen tRNA-Q und 5S rRNA, da diese im RIP-Chip nicht angereichert sind und auch im *Dot-Blot* lässt sich kein Signal im Präzipitat detektieren. Insgesamt können die *Dot-Blot*-Experimente die RIP-Chip Experimente bestätigen.

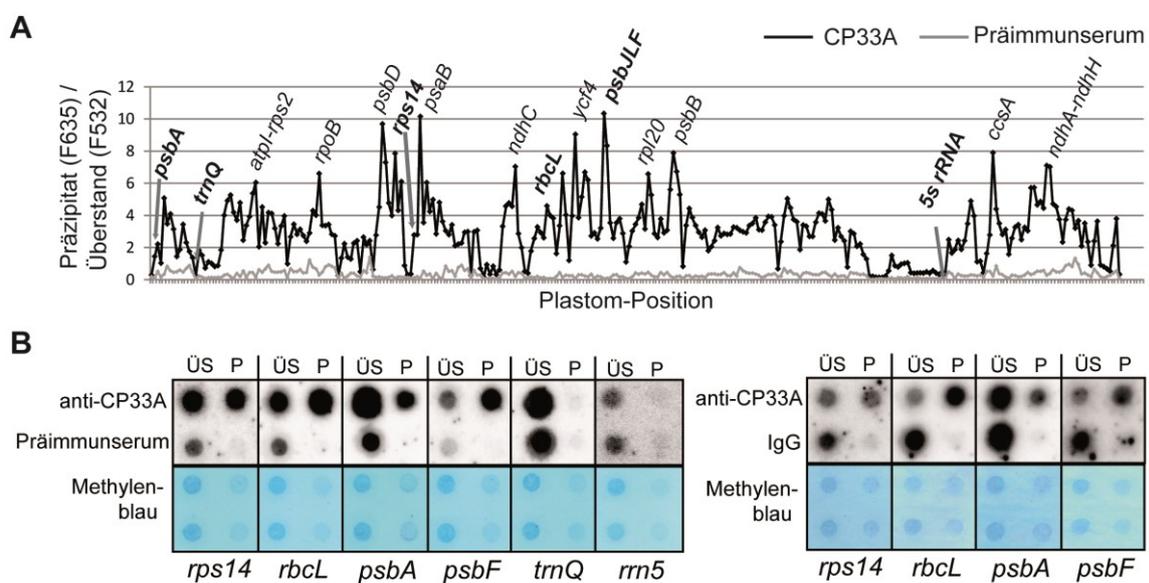


Abb. 7: Der Hauptteil chloroplastidärer mRNAs assoziiert mit CP33A

(A) Verhältnisse der Fluoreszenzsignale aus kopräzipitierter RNA (F635) und ungebundener RNA (F532) aufgetragen gegen die Position auf dem Chloroplastengenom. Die CP33A-Immunopräzipitation und die Kontroll-Präzipitation mit dem entsprechenden Präimmunsrum wurden mit jeweils drei biologischen Replikaten durchgeführt. Die Präzipitat/Überstand Verhältnisse (Median (*Median of Ratios*)) wurden auf die Summe der Medianwerte der ribosomalen RNAs der Überstände (Median F532) normalisiert (Daten in Teubner et al. 2017). Gekennzeichnet im Diagramm sind Transkripte mit den höchsten Anreicherungswerten sowie RNAs (fettgedruckt), die in *Dot-Blot*-Analysen (siehe B) untersucht wurden. (B) Die RIP-Chip Ergebnisse aus (A) wurden durch *Dot-Blot*-Analysen validiert. Die CP33A-Immunopräzipitationen erfolgten auf Wildtyp-Stroma mit dem CP33A Antikörper (Peptid b) und als Kontrollen dienten entweder das entsprechende Präimmunsrum (links) oder aufgereinigtes Immunglobulin (IgG, rechts). Gleiche Volumenanteile der isolierten RNAs von Präzipitat (P) und Überstand-Fraktion (ÜS) wurden auf Nylonmembranen transferiert und mit verschiedenen radioaktiv markierten RNA-Sonden hybridisiert. Die Methyleneblaufärbung der Nylonmembranen spiegelt den gesamten RNA-Gehalt der einzelnen Fraktionen wieder.

3.2.3 CP33B interagiert mit vielen plastidären RNAs, präferenziell mit *psbA*

Die CP33B RIP-Chip-Experimente wurden auf gleiche Weise wie die RIP-Chips für CP33A durchgeführt und ausgewertet (s. Kap. 3.2.2). Nach der Auftragung der Verhältnisse der Fluoreszenzsignale aus kopräzipitierter RNA (F635) und ungebundener RNA (F532) gegen

die Position auf dem Chloroplastengenom (Abb. 8A) wird deutlich, dass auch CP33B mit einem großen Anteil der plastidären RNAs und ganzen Operons assoziiert, wie dem *atpI-H-F-A-*, *psbD-C-*, *psaA-psaB-rps14-* und dem *ndhC-K-J-*Operon. Jedoch weisen einige mRNAs keine Anreicherung auf, z.B. *psbM*, *psbN*, *rpl32*, *rps2* sowie die Transkripte des *psbE-F-L-J-*, des *atpE-atpB-* und die ersten vier Transkripte des *petL-petG-psaJ-rpl33-rps18-* Operons. Zusätzlich kopräzipitieren ribosomale RNAs und die meisten tRNAs nicht mit CP33B.

Auffallend für die IP mit anti-CP33B ist eine starke Akkumulation des *psbA* Transkriptes. So zeigt die *psbA* mRNA eine zehnfach stärkere Anreicherung als der Durchschnitt aller anderen Ziel-RNAs und eine viermal höhere Anreicherung als das am zweitstärksten angereicherte Transkript *atpH* (Daten s. Tabelle 6).

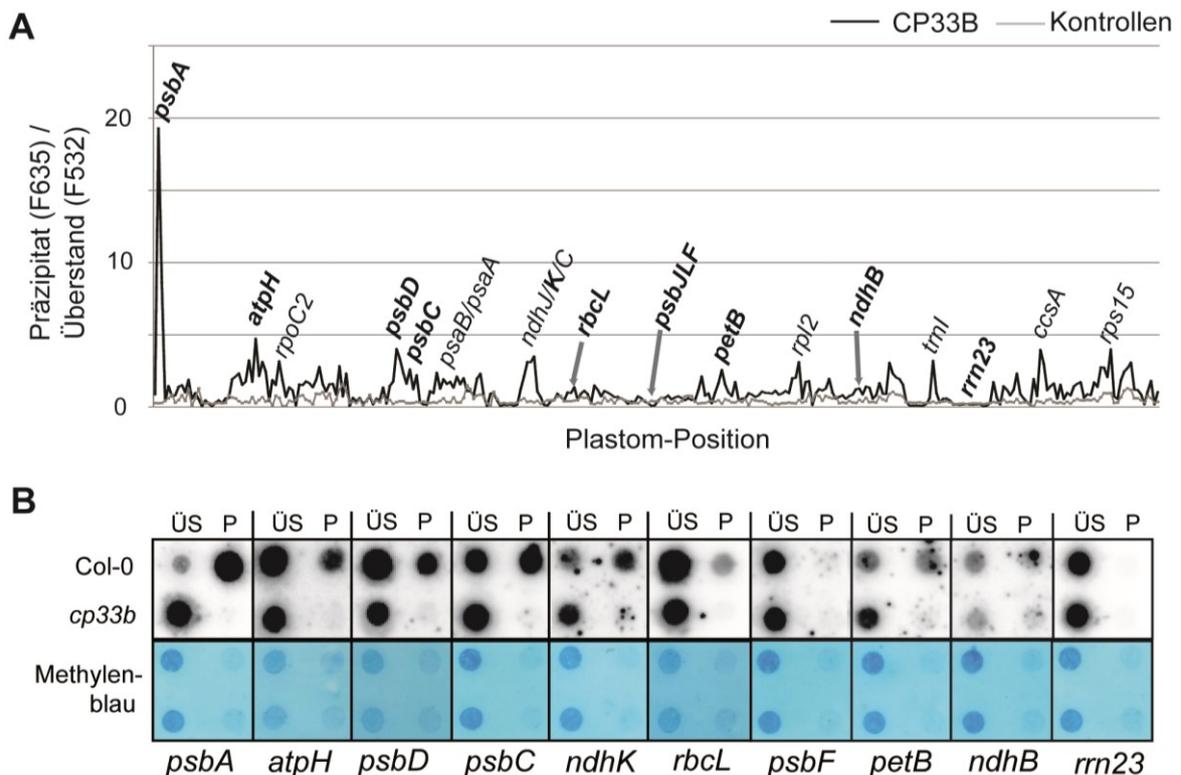


Abb. 8: CP33B assoziiert mit multiplen plastidären Transkripten und mit dem Hauptteil der *psbA* mRNA
 (A) Verhältnisse der Fluoreszenzsignale aus kopräzipitierter RNA (F635) und ungebundener RNA (F532) aufgetragen gegen die Position auf dem Chloroplastengenom. Es wurden drei biologische Replikate von der CP33B-Immunopräzipitation und als Kontroll-Präzipitation zwei Replikate mit dem entsprechenden Präimmunserum und eine IP auf Stroma von *cp33b*-Nullmutanten durchgeführt. Die Präzipitat/Überstand Verhältnisse (Median (*Median of Ratios*)) wurden auf die Summe der Medianwerte der ribosomalen RNAs der Überstände (Median F532) normalisiert (Daten in Tabelle 6, Anhang). Gekennzeichnet im Diagramm sind Transkripte mit den höchsten Anreicherungswerten sowie RNAs (fettgedruckt) die in *Dot-Blot*-Analysen (siehe B) untersucht wurden. (B) Die RIP-Chip Ergebnisse aus (A) wurden durch *Dot-Blot*-Analysen validiert. Die CP33B-Immunopräzipitationen erfolgten auf Stroma aus Wildtyp und *cp33b*-Nullmutanten. Gleiche Volumenanteile der isolierten RNAs von Präzipitat (P) und Überstand-Fraktion (ÜS) wurden auf Nylonmembranen transferiert und mit verschiedenen radioaktiv markierten RNA-Sonden hybridisiert. Die Methylenblaufärbung der Nylonmembranen spiegelt den gesamten RNA-Gehalt der einzelnen Fraktionen wieder. Die Analyse wurde für *psbA* zweimal und für *rbcL* und *rrn23* ein weiteres Mal mit ähnlichem Ergebnis wiederholt.

Bei der Verifizierung der RIP-Chip-Daten mittels *Dot-Blot*-Analysen wurden Immunopräzipitationen aus *cp33b*-Nullmutanten als Kontrollen benutzt (Abb. 8B). Eine Auswahl chloroplastidärer Transkripte wurde mit radioaktiv markierten RNA-Sonden analysiert. Als Negativkontrollen dienen Sonden für *psbF* und der 23S rRNA, die jeweils keine Anreicherung im RIP-Chip zeigen. Dies bestätigte sich auch im *Dot-Blot*. Für alle anderen getesteten Transkripte wird eine Akkumulation in den Präzipitaten des Wildtyp-Stromas detektiert, jedoch nicht in den Präzipitaten der Mutanten. Nach der Quantifizierung der Überstands- und Präzipitat-Signale ergibt sich für *psbA* eine etwa zehnfache Anreicherung im Präzipitat. Damit ist der Großteil der im Stroma befindlichen *psbA* mRNA mit CP33B assoziiert. Mindestens gleiche Anteile des *psaC*- und *ndhK*-Transkriptes kopräzipitieren mit CP33B wie im Überstand zurückbleiben. Die geringste Anreicherung weist die *rbcL* mRNA auf. Insgesamt bestätigen die *Dot-Blot*-Analysen die Ergebnisse der RIP-Chip Experimente.

3.3 CP33A und CP33B assoziieren nicht mit Polysomen, aber mit hochmolekularen Komplexen

Koexpressionsanalysen der Datenbank ATTED II (Obayashi et al. 2018, <http://atted.jp/>) zeigen für CP33B eine starke Koexpression mit ribosomalen Proteinen und für CP33A mit einem Elongations- und Initiations-Faktor der plastidären Translation. Außerdem koexprimieren beide Proteine mit CP29C, einem weiteren Mitglied der cpRNP-Familie aus Arabidopsis. CP29C ist ein Bestandteil des plastidären Translationsapparates (mehr zu CP29C/PSRP2 s. Einleitung Kap. 1.4.1.2). Um zu prüfen, ob auch CP33A und CP33B Funktionen innerhalb der Translationsmaschinerie der Chloroplasten ausüben, wurde deren Assoziation mit ribosomalen Komplexen überprüft. Hierfür wurden intakte Polysomen aus Arabidopsis Blattlysaten präpariert (Barkan 1993) und anschließend auf einem Saccharosegradienten größenfraktioniert. Aus den einzelnen Fraktionen konnten anschließend RNA und Proteine extrahiert und untersucht werden. Die Verteilung der ribosomalen RNAs innerhalb des Dichtegradienten entspricht dem erwarteten Muster (Abb. 9) und belegt eine erfolgreiche Auftrennung der Ribosomen in Monosomen (bis Fraktion 4) und Polysomen (ab Fraktionen 5) (Barkan 1993, Roy und Barkan 1998). In den Western-Analysen werden CP33A und CP33B fast ausschließlich in den ersten drei bis vier Fraktionen detektiert, welches einer Lokalisation der Monosomen entspricht (Abb. 9).

Übereinstimmend mit der fehlenden Polysomenassoziation, interagieren CP33A und CP33B nur schwach oder gar nicht mit rRNAs und tRNAs (s. Abb. 7 und Abb. 8). Damit scheinen

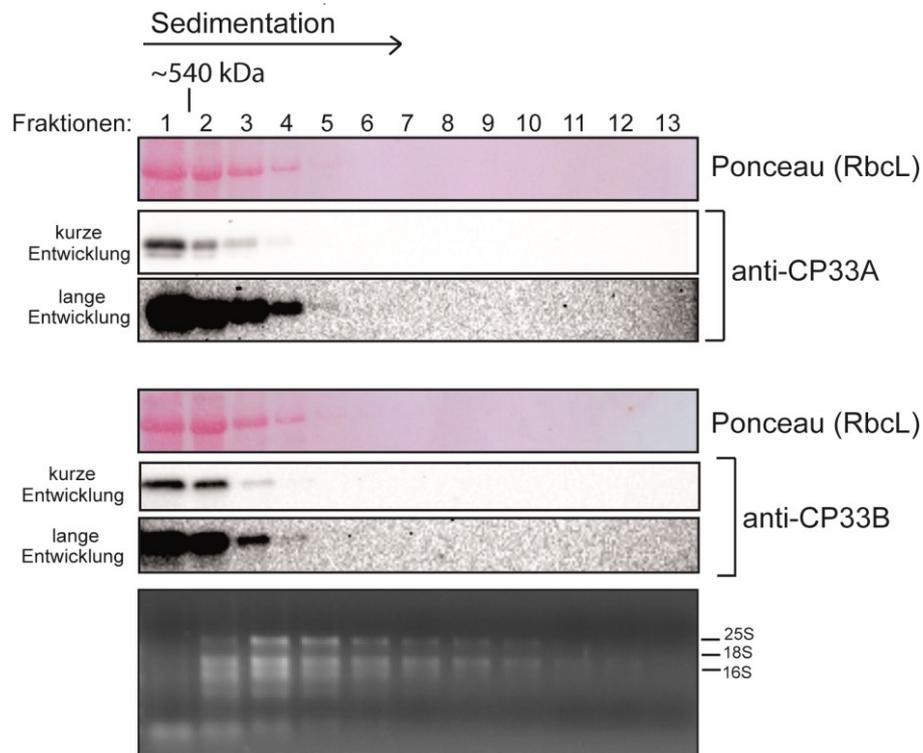


Abb. 9: CP33A und CP33B sedimentieren nicht in die Polysomen-Fractionen

Intakte Polysomen aus Wildtyp-Lysaten wurden auf Saccharosegradienten (15%-55%) größenfraktioniert. Die Lokalisation von CP33A und CP33B innerhalb des Gradienten wurde in einer Western-Analyse der Proteinextrakte der einzelnen Fraktionen durch die Verwendung spezifischer Antikörper aufgezeigt. Vom selben Blot wurden jeweils zwei verschiedenen lange Entwicklungszeiten dargestellt. Ein Ausschnitt der Ponceaufärbung ist gezeigt (RbcL). Außerdem wurde RNA aus den einzelnen Fraktionen isoliert, auf einem Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt (unteres Bild). Die Verteilung der ribosomalen RNAs weist auf intakte Polysomen hin. So befinden sich Monosomen in den ersten vier Fraktionen und in den dichteren Fraktionen Polysomen (Roy und Barkan 1998). Die Analyse wurde ein weiteres Mal mit ähnlichem Ergebnis wiederholt.

beide cpRNPs folglich keine konstitutiven Faktoren translatierender Ribosomen zu sein. Dieses Ergebnis bestätigt eine ältere Studie aus Tabak, in denen gezeigt wurde, dass cpRNPs an Ribosom-freie mRNAs binden (Nakamura et al. 2001). Auch wenn beide Proteine nicht an der Elongation der Translation beteiligt sind, ist eine Beteiligung innerhalb der Initiation der Translation noch nicht ausgeschlossen (s. dazu Kap. 3.6.6). Zur Verifizierung und um potentiell schwache Interaktionen mit Polysomen auszuschließen, die während der experimentellen Prozedur verloren gegangen sein könnten, wären weitere Experimente wie z.B. Crosslinking von Proteinen (Sinz 2014) sinnvoll.

In Tabak wurden einige Vertreter der cpRNPs in hochmolekularen Komplexen von bis zu 600 kDa identifiziert (Nakamura et al. 2001). Zudem wurde CP33B nach Größenausschluss-Chromatographie-Experimenten auf Stroma-Fractionen aus Arabidopsis in Komplexen von 0,8 bis 2 MDa nachgewiesen (Olinares et al 2010). Die Ponceaufärbung der Westernmembran verdeutlicht eine Hauptlokalisierung von RuBisCO in den ersten zwei Fraktionen. Das

RuBisCO-Holoenzym hat ein Molekulargewicht von 540 kDa. Einzelne Ribosomen (70S) haben ein Molekulargewicht von 2500 kDa und wandern im Dichtegradienten ungefähr bis zur 4. Fraktion (laut Roy und Barkan 1998). Da CP33A und CP33B in den Fraktionen 3 und 4 schwach detektierbar sind, scheinen sie somit womöglich in einem geringen Maße Bestandteil von einem hochmolekularen Proteinkomplex (bis zu 2500 kDa) zu sein. Zur Verifizierung dieses Ergebnisses, ist die Dissoziation der cpRNP-Komplexe als Kontrolle, z.B. durch die Zugabe von EDTA, unbedingt erforderlich.

3.4 Analyse der *cp33a*-Nullmutanten

3.4.1 Die Depletion von CP33A führt zu einem drastischen Phänotyp

Um die mögliche Funktion von CP33A innerhalb des chloroplastidären RNA-Metabolismus zu untersuchen, wurde auch ein revers-genetischer Ansatz verfolgt. Der Insertionsort von drei T-DNA-Insertionslinien wurde mittels PCR (Anhang Abb. 2; Primersequenzen in Tabelle 3, Anhang) und anschließender Sequenzierung verifiziert. Bei der Linie *cp33a-2* (SALK_102657) handelt es sich um eine T-DNA-Insertion stromaufwärts vom Leserahmen (Abb. 10A), innerhalb der 5'-nichttranslatierten Region (5'-UTR). Die T-DNA der *cp33a-1* (SALK_151814) Linie lokalisiert im 3.Exon innerhalb der kodierenden Region von CP33A. Dagegen befindet sich in der *cp33a-3* (CS16232) Linie eine große Deletion genomischer DNA, in der Region der T-DNA-Insertion (Abb. 10A).

Nach der Aussaat und Anzucht der drei verschiedenen T-DNA-Linien auf Erde unter Standardbedingungen, wurden homozygote Pflanzen lediglich für die *cp33a-2*-Linie identifiziert. Diese homozygoten *cp33a-2* Pflanzen zeigen keinen vom Wildtyp abweichenden Phänotyp. Dagegen waren alle *cp33a-1* und *cp33a-3* Pflanzen entweder heterozygote bzw. wildtypische Pflanzen. Dies ist ein erster Hinweis, dass homozygote Pflanzen dieser zwei Linien eine embryonale oder frühe Keimlings-Letalität aufweisen. Auf einem Medium versetzt mit Saccharose (3%), Vitaminen und Mineralien konnten homozygote Pflanzen der Linien *cp33a-1* und *cp33a-3* erhalten werden. Ungefähr $\frac{1}{4}$ der gekeimten Samen einer heterozygoten Mutterpflanze zeigt einen veränderten Phänotyp, mit einer starken Wachstumseinschränkung. Selbst nach einem fünfwöchigen Wachstum auf dem Saccharose-Medium bleiben diese Pflanzen unter einer Größe von 1cm (Abb. 10C). Wildtyp-Pflanzen, die gleichzeitig angezogen wurden, fangen zu diesem Zeitpunkt bereits an zu blühen. Abgesehen von der starken Wachstumseinschränkung sind die Blätter der homozygoten *cp33a-1* und *cp33a-3* Pflanzen weiß bis lila gefärbt und ihre Form ist anomal, länglich und ohne

Symmetrie (Abb. 10C). Mittels PCR kann die Homozygotie von *cp33a-1* und *cp33a-3* bestätigt werden (Anhang Abb. 2). Beide Linien weisen einen identischen Phänotyp auf, welcher damit sehr wahrscheinlich durch den Verlust von CP33A verursacht wird.

Eine Western-Analyse mit anti-CP33A (Antikörper Peptid a) auf Gesamtproteinextrakten von wildtypischen, homozygoten und heterozygoten Pflanzen der *cp33a-1* und *cp33a-3* Linie sollte die Depletion von CP33A bestätigen (Abb. 10B). In den homozygoten Pflanzen ist kein Signal auf der Höhe von CP33A (35,7 kDa) detektierbar. Dagegen sind in den heterozygoten Pflanzen die Signale und damit die Proteinmengen von CP33A um ca. 50% reduziert (Berechnung mittels Image Lab Software (Bio-Rad)). Trotz dieser Reduktion weisen heterozygote *cp33a-1* und *cp33a-3* Pflanzen unter Standardwachstumsbedingungen keinen vom Wildtyp abweichenden Phänotyp auf. Die Proteinmenge von CP33A ist in homozygoten Pflanzen der *cp33a-2* Linie im Durchschnitt sogar um 70 % reduziert (Anhang Abb. 3), jedoch zeigen auch diese Pflanzen keinen veränderten Phänotyp.

Insgesamt belegen diese Ergebnisse, dass es sich bei den beiden homozygoten *cp33a-1* und *cp33a-3* Mutanten um Null-Mutationen handelt und CP33A für die Chloroplasten-Biogenese essentiell ist.

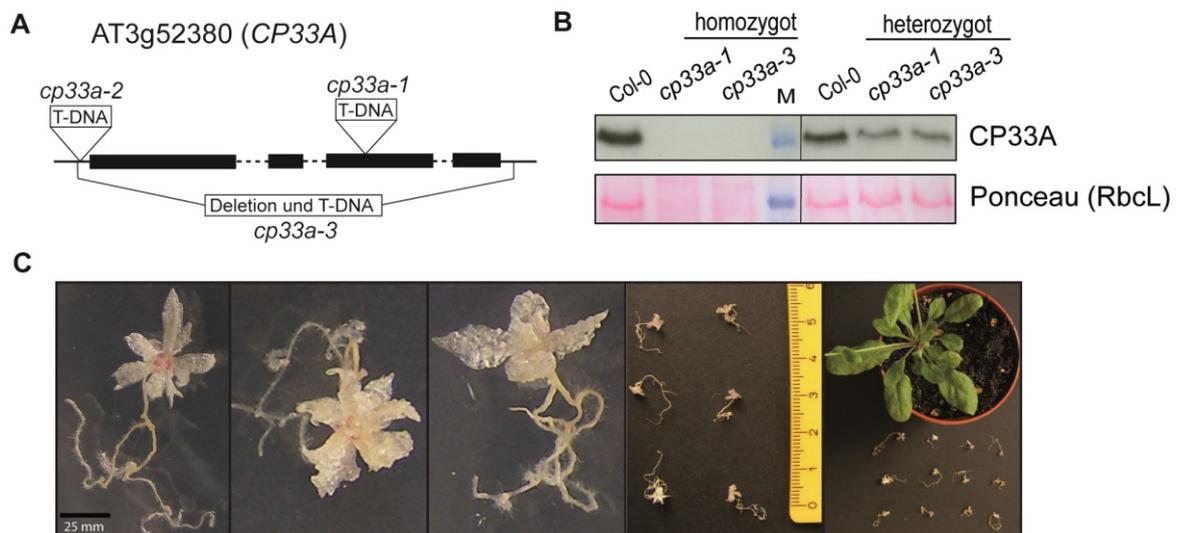


Abb. 10: Identifizierung von *cp33a*-Nullmutanten mit starken Wachstumsdefekten

(A) Genkarte von *CP33A* (AT3g52380), bestehend aus 4 Exons (schwarze Balken) und drei Introns (gestrichelte Linie). Die Lokalisation der T-DNA-Insertionen von drei verschiedenen Pflanzenlinien sind gekennzeichnet, *cp33a-1* (SALK_151814), *cp33a-2* (SALK_102657), und *cp33a-3* (CS16232). (B) Immunologische Untersuchung mit anti-CP33A (Antikörper a) von Gesamtproteinextrakten von wildtypischen (Col-0), homozygoten und heterozygoten Pflanzen der *cp33a-1* und *cp33a-3* Linien. Gleiche Proteinmengen wurden per SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Ein Ausschnitt der Ponceaufärbung ist gezeigt (RbcL). Die Analysen wurden mehrmals mit demselben Ergebnis wiederholt. (C) Phänotyp der *cp33a-1* Pflanzen, welche für 35 Tage unter Standardwachstumsbedingungen auf einem Medium versetzt mit Saccharose (3%), Vitaminen und Mineralien wuchsen. Rechtes Bild zeigt eine Wildtyp-Pflanze (Columbia-0) im gleichen Alter, angezogen für 14 Tage auf demselben Medium und dann auf Erde transferiert.

3.4.2 Globaler Verlust von plastidären Proteinen in *cp33a*-Nullmutanten

Der Albino-Phänotyp der *cp33a*-Mutanten (Abb. 10C) weist auf eine gestörte Biogenese des Photosyntheseapparates hin. Um dies zu bestätigen wurden immunologische Untersuchungen von verschiedenen Untereinheiten der Photosynthese-Maschinerie von Gesamtproteinextrakten von Wildtyp, *cp33a-1* und Spectinomycin-behandelten Wildtyp-Pflanzen durchgeführt. Das Antibiotikum Spectinomycin ist ein Inhibitor der plastidären Translation und führt zu einem albinotischen Phänotyp, ähnlich dem der *cp33a*-Mutanten (Anhang Abb. 4). Immunologisch analysiert wurden ausgewählte Untereinheiten von Photosystem I (PsaD), Photosystem II (D1 und PsbP), ATP-Synthase (AtpA), Cytochrom-*b6f*-Komplexes (PetD und PetA) sowie der großen Untereinheit von RuBisCO (RbcL). Alle untersuchten plastidären Proteine zeigen eine starke Reduktion in den *cp33a-1* und den Spectinomycin-behandelten Pflanzen (Abb. 11A). Damit entspricht das Proteinmuster von *cp33a-1* dem erwarteten Muster von albinotischem Gewebe, dessen Chloroplasten-Translation blockiert ist.

In Albino-Pflanzen kommt es durch einen oder auch mehreren primären Defekte/n zum Verlust der Photosynthese. Dieser Verlust kann zu vielen sekundären Defekten führen, wie z.B. zur Reduktion chloroplastidärer Proteine. Daher ist es schwierig einen primären Defekt in Albino-Pflanzen durch die Untersuchung der Proteinakkumulation zu entschlüsseln. Besser geeignet sind Untersuchungen mit hypomorphen Mutanten. Heterozygote Pflanzen der *cp33a-3* Linie und homozygote *cp33a-2* Pflanzen weisen jeweils eine Reduktion der CP33A-Proteinmenge von bis zu 50 % (Abb. 10B) bzw. 70 % (Anhang Abb. 3) auf.

In dieser Studie wurden, durch Kreuzungen von *cp33a-3* und *cp33a-2* Pflanzen, Doppelmutanten erzeugt. Ähnlich den Einzelmutanten, zeigen auch die Doppelmutanten keine makroskopischen Defekte (Bilder nicht gezeigt). Die Proteinmengen von CP33A sind in den Doppelmutanten bis zu 80% reduziert. Hierfür wurden die Proteinsignale von CP33A und des Kontroll-Proteins Hsp70 mittels der Image Lab Software (Bio-Rad) bestimmt (Abb. 11B). Damit hat sich die CP33A-Proteinmenge durch die Kreuzung leicht verringert.

Die hypomorphen Doppelmutanten wurden genutzt, um verschiedene Proteine der Photosynthese-Maschinerie (PS I: PsaA und PsaD; PS II: PsbP; Cytochrom-*b6f*-Komplex: PetD und durch Ponceau-Färbung RbcL: RuBisCO) zu untersuchen (Abb. 11C). Als Beladungskontrolle diente der Nachweis des mitochondrialen CoxII Proteins. Für alle getesteten Proteine ist keine Reduktion in den Mutanten detektierbar. Offensichtlich ist die gebildete Menge an CP33A in den hypomorphen Doppelmutanten ausreichend, um ein normales Expressionslevel der untersuchten Photosyntheseproteine aufrechtzuerhalten.

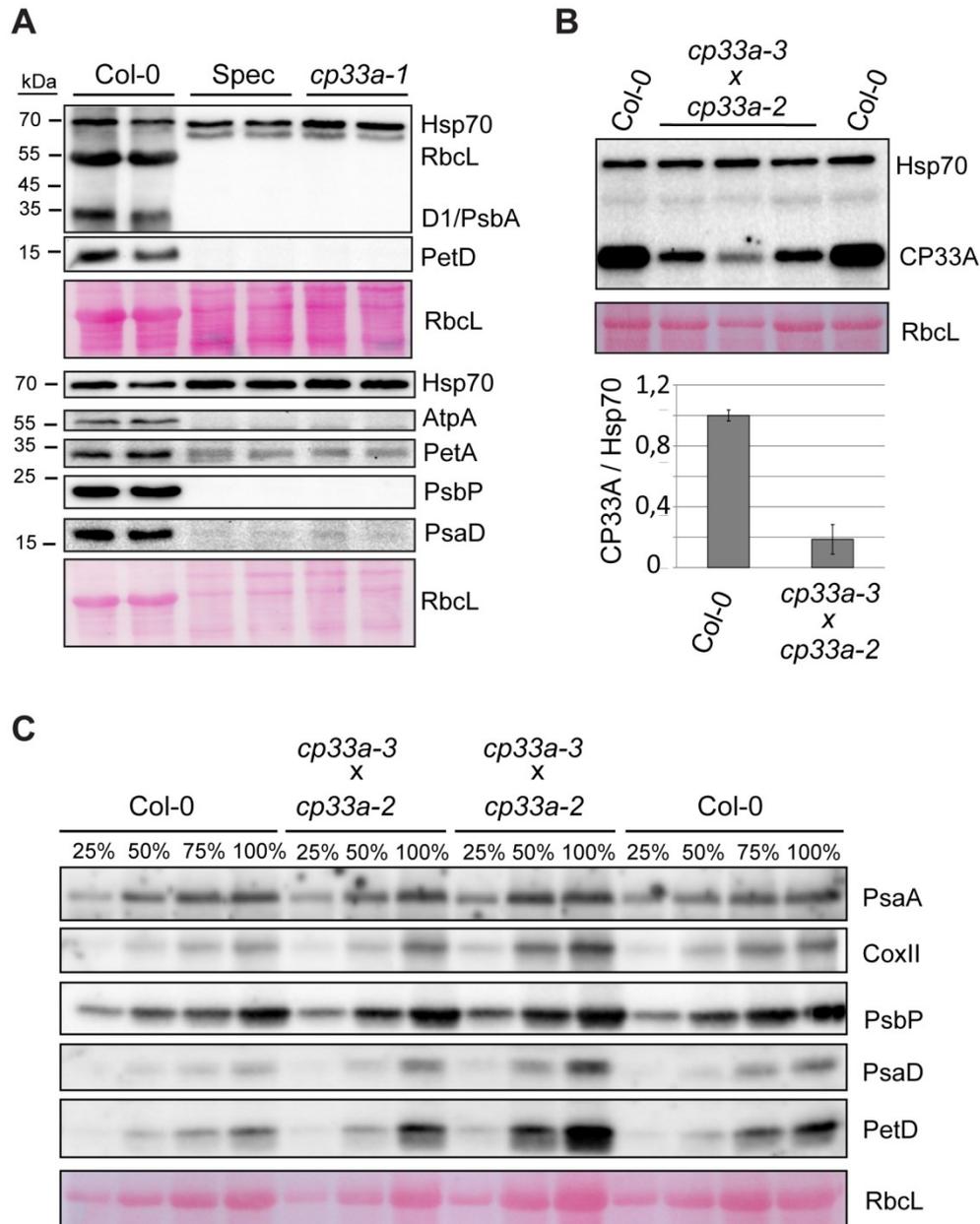


Abb. 11: Analyse der Akkumulation photosynthetischer Proteine in *cp33a*-Mutanten

Gleiche Proteinmengen (in A und B) bzw. unterschiedliche Anteile (in C: 25% - 100%) von Gesamtproteinextrakten aus Wildtyp und verschiedenen Mutanten-Pflanzen wurden per SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembranen transferiert. (A) Wildtyp-Pflanzen, Spectinomycin-behandelte Wildtyp-Pflanzen und *cp33a-1* Mutanten wurden immunologisch auf die Akkumulation verschiedener Untereinheiten photosynthetischer Proteine untersucht: von Photosystem I (PsaD), von Photosystem II (D1 und PsbP), der ATP-Synthase (AtpA), des Cytochrom-*b6f*-Komplexes (PetD und PetA) sowie der großen Untereinheit von RuBisCO (RbcL). Die Detektion von Hsp70 diente als Ladungskontrolle. (B) Proteinmengen von CP33A wurden in Wildtyp-Pflanzen und *cp33a-3* x *cp33a-2* Doppelmутanten mit anti-CP33A (Antikörper a) untersucht. Die Detektion von Hsp70 diente als Ladungskontrolle. Die Signale wurden mittels der Image Lab Software (Bio-Rad) quantifiziert. Der Mittelwert der CP33A/Hsp70 Quotienten wurde aus jeweils 3 biologischen Replikaten (ein WT-Replikat ist nicht im Westernbild abgebildet) berechnet und mit der Standardabweichung dargestellt. (C) Immunologische Analysen in Wildtyp und *cp33a-3* x *cp33a-2* Doppelmутanten von photosynthetischen Proteinen: Photosystem I (PsaA und PsaD), Photosystem II (PsbP), Cytochrom-*b6f*-Komplex (PetD) und durch die Ponceau-Färbung RbcL (RuBisCO). Die Detektion des mitochondrialen CoxII (Cytochrom Oxidase II) Proteins diente als Ladungskontrolle.

3.4.3 Untersuchung plastidärer Transkripte in *cp33a*-Nullmutanten

3.4.3.1 Globale RNA-Reduktion in *cp33a*-Nullmutanten

Für einige Vertreter der cpRNPs konnte eine Beteiligung an der Stabilisierung von plastidären RNAs sowohl *in vitro* (Nakamura et al. 2001) als auch *in vivo* (Tillich et al. 2009, Kupsch et al. 2012) bereits belegt werden. Um die RNA-Akkumulation auf globaler Ebene in den *cp33a*-Nullmutanten zu untersuchen, wurden qRT-PCR (quantitative Real-Time PCR) Analysen durchgeführt. Die qRT-PCR ermöglichte die Quantifizierung aller Proteinkodierenden Transkripte des Chloroplasten als auch die der 23S und 16S rRNAs im Vergleich zum Wildtyp. Als Phänotyp-Kontrollen dienen auch diesmal Wildtyp-Pflanzen die auf Spectinomycin-haltigem Medium angezogen wurden. Die relativen Transkriptmengen der *cp33a*-Mutanten und der Spectinomycin-behandelten Pflanzen sind als Quotienten zu den Transkriptmengen des Wildtyps in einem Diagramm aufgetragen (Abb. 12).

Das Transkriptom-Profil der *cp33a*-Nullmutanten ähnelt stark dem Profil der Spectinomycin-behandelten Wildtyp-Pflanzen, mit dem Unterschied, dass der Kurvenverlauf in den *cp33a* Pflanzen allgemeinen nach unten verschoben ist. Bei Einbeziehung der Standardabweichungen der qRT-PCR Daten sind 62 RNAs von insgesamt 76 untersuchten RNAs in den *cp33a*-Mutanten gegenüber den Spectinomycin-behandelten Pflanzen reduziert. 55 der RNAs zeigen sogar eine Zweifache Reduktion (s. Tabelle 10 Anhang). Einige der RNAs akkumulieren allerdings gleich stark in den *cp33a*-Mutanten und Spectinomycin-behandelten Pflanzen (*rrn16*, *rrn23*, *psbA*, *psbI*, *rps12A*, *rpl2* und *rps14*, s. Tabelle 10 Anhang), daher kann ein systematischer Fehler wie z.B. in der Normalisierung der Daten ausgeschlossen werden. Vor allem Transkripte die von der plastidär kodierten RNA-Polymerase (PEP) abgelesen werden (Allison et al. 1996, Hajdukiewicz et al. 1997, Legen et al. 2002), sind in den *cp33a*-Mutanten und den Spectinomycin-behandelten Wildtyp-Pflanzen gegenüber dem Wildtyp stark reduziert. Dabei handelt es sich um fast alle mRNAs, welche für Komponenten der Photosynthese-Maschinerie kodieren, wie Photosystem I, Photosystem II, Cytochrom-b6f-Komplex, ATP-Synthase und der NDH-Komplex. Auch ribosomale RNAs werden durch die PEP abgelesen und sind in den *cp33a*-Mutanten und Spectinomycin-behandelten Pflanzen stark erniedrigt.

Lediglich die Spectinomycin-behandelten zeigen gegenüber dem wildtypischen Pflanzen eine Steigerung der Transkriptmengen von Genen die für Komponenten der Protein-Homöostase (*clpP*) und der Genexpressionsmaschinerie, wie ribosomale Proteine (z.B. *rps11*, *rpl36*, *rps8*, *rpl22*, *rps15*) und Untereinheiten der PEP (*rpoA*, *rpoB*, *rpoC1* und *rpoC2*) kodieren. Diese

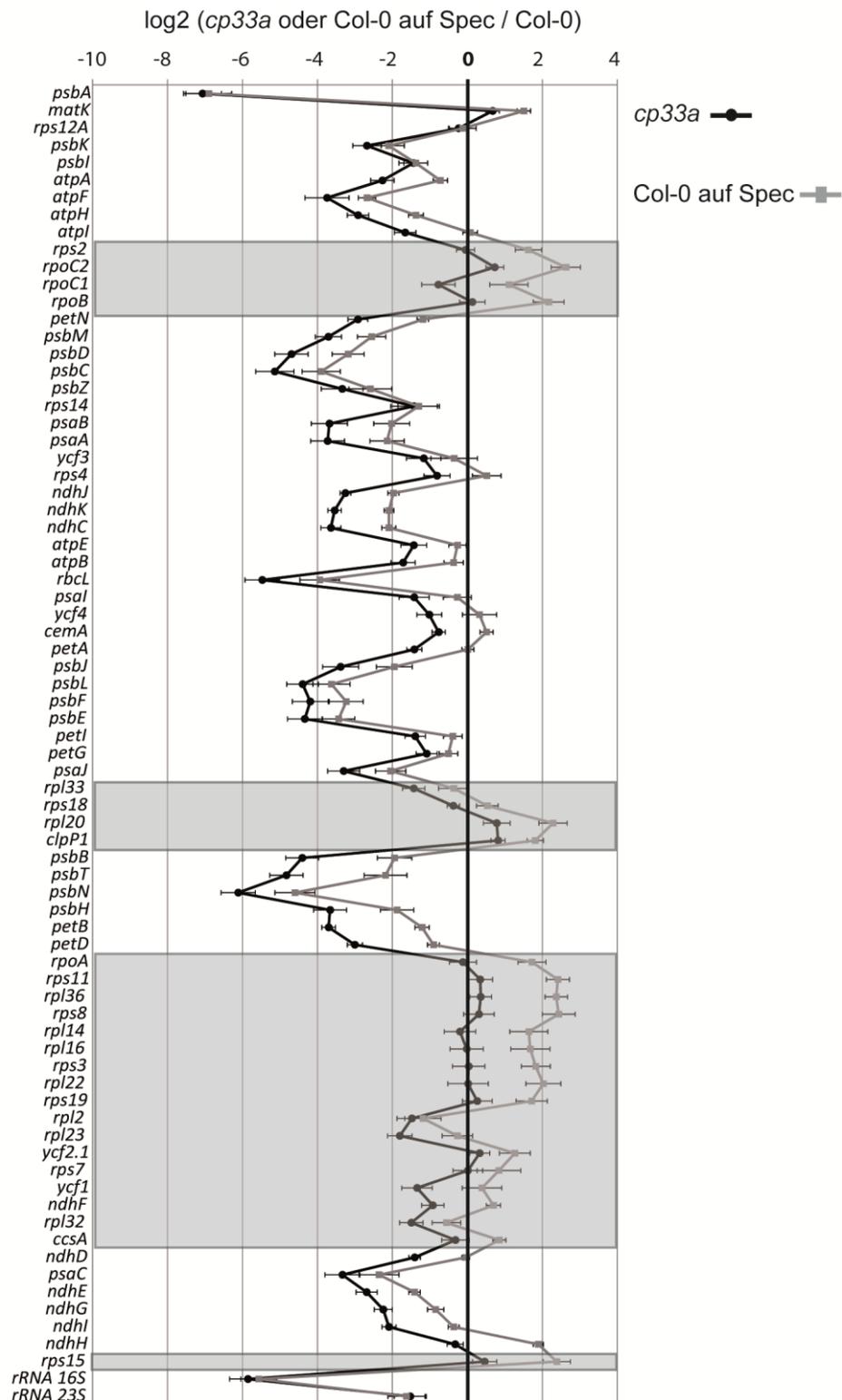


Abb. 12: Allgemeine Reduktion chloroplastidärer RNAs in *cp33a*-Nullmutanten

Quantitative Real-Time (qRT) PCR wurde durchgeführt um Transkriptmengen plastidärer RNAs auf Transkriptom-Ebene zu untersuchen. Neben der Analyse von 14 Tage alten Wildtyp und *cp33a-1* Mutanten, dienten Spectinomycin-behandelte Wildtyp-Pflanzen als Phänokopie-Kontrolle. Es wurden jeweils zwei biologische Replikate untersucht. Die Messung der *Actin*-mRNA diente zur Normalisierung der relativen RNA-Konzentrationen, welche anschließend gemittelt und als Log₂ Quotient gegen den Wildtyp in einem Diagramm aufgetragen wurden (Daten in Teubner et al. 2017). Gene die bekanntermaßen durch NEP (nukleär kodierte plastidäre RNA-Polymerase) transkribiert werden, sind grau unterlegt.

Transkripte werden durch die nukleär kodierte plastidäre RNA-Polymerase (NEP) gebildet. Damit spiegelt das gesamte Transkriptom-Profil der Spectinomycin-behandelten Pflanzen das erwartete Muster von Albino-Pflanzen, die eine Blockade in der plastidären Translation aufweisen, wieder (Aryamanesh et al. 2017). Solch eine Translationsinhibierung wie sie in den Spectinomycin-behandelten Pflanzen vorliegt, führt zur Unterbrechung der PEP-Expression und wie bereits in verschiedenen Studien belegt, kommt es dadurch zur Reduktion der PEP-abhängigen Transkriptmengen bei gleichzeitiger Steigerung der NEP-abhängigen Transkriptmengen (Hajdukiewicz et al. 1997, Legen et al. 2002, Chateigner-Boutin et al. 2008, Pfalz et al. 2006).

In *cp33a*-Mutanten sind wenige NEP-Transkripte marginal gegenüber dem Wildtyp erhöht (*matK*, *rpoC2*, *rpl20*, *clpP* und *rps15*), die meisten sind auf Wildtyp-Niveau (*rpoA*, *rpoB*, *ycf2* sowie viele Transkripte ribosomaler Proteine) oder reduziert. Jedoch sind alle NEP-Transkripte in den *cp33a*-Mutanten gegenüber Spectinomycin-behandelten Pflanzen reduziert. Insgesamt kommt es in den *cp33a*-Pflanzen zu einem globalen RNA-Verlust, der am stärksten für PEP-abhängige Transkripte ausgeprägt ist. Dabei ist die Reduktion der RNAs noch drastischer, als in Pflanzen mit einer Translations-Defizienz.

3.4.3.2 Spezifische Reduktion langer Vorläufer-RNAs in *cp33a*-Nullmutanten

Zur Bestätigung der qRT-PCR Daten (Kapitel 3.4.3.1) und um das genaue Transkriptmuster einzelner RNAs zu untersuchen, wurden Northern-Analysen durchgeführt. Neben der Verwendung von Wildtyp-Pflanzen, *cp33a*-Mutanten und Spectinomycin-behandelten Wildtyp-Pflanzen wurden teilweise auch Wildtyp-Pflanzen, die auf Norflurazon-haltigem Medium angezogen wurden, verwendet. Norflurazon hemmt spezifisch die Phytoen-Desaturase, welche für die Carotinoid-Biosynthese nötig ist, was schließlich zu einer gestörten Chloroplasten-Biogenese und Albinismus führt (Ben-Aziz und Koren 1974). Damit dienen Norflurazon-behandelte Pflanzen als weitere Phänotyp-Kontrollen.

In den Northern-Analysen wurden verschiedene NEP- und PEP-abhängige Transkripte untersucht. Sowohl Transkripte die ausschließlich durch die PEP (*psbA*, *psbF*, *rbclL*, *petB*, *rrn23* und *rrn16*), als auch Transkripte die hauptsächlich durch die PEP (*ndhB*, *ycf3*) abgelesen werden, waren in den *cp33a*-Mutanten und in den Antibiotika-behandelten (Spectinomycin und Norflurazon) Pflanzen stark reduziert (Abb. 13). Dies bestätigt die qRT-PCR-Daten und war für albinotisches Gewebe, deren PEP-Aktivität verhindert ist, zu erwarten. Im Gegensatz zu den qRT-PCR Daten sind die *petB*-Transkripte in den Northern-

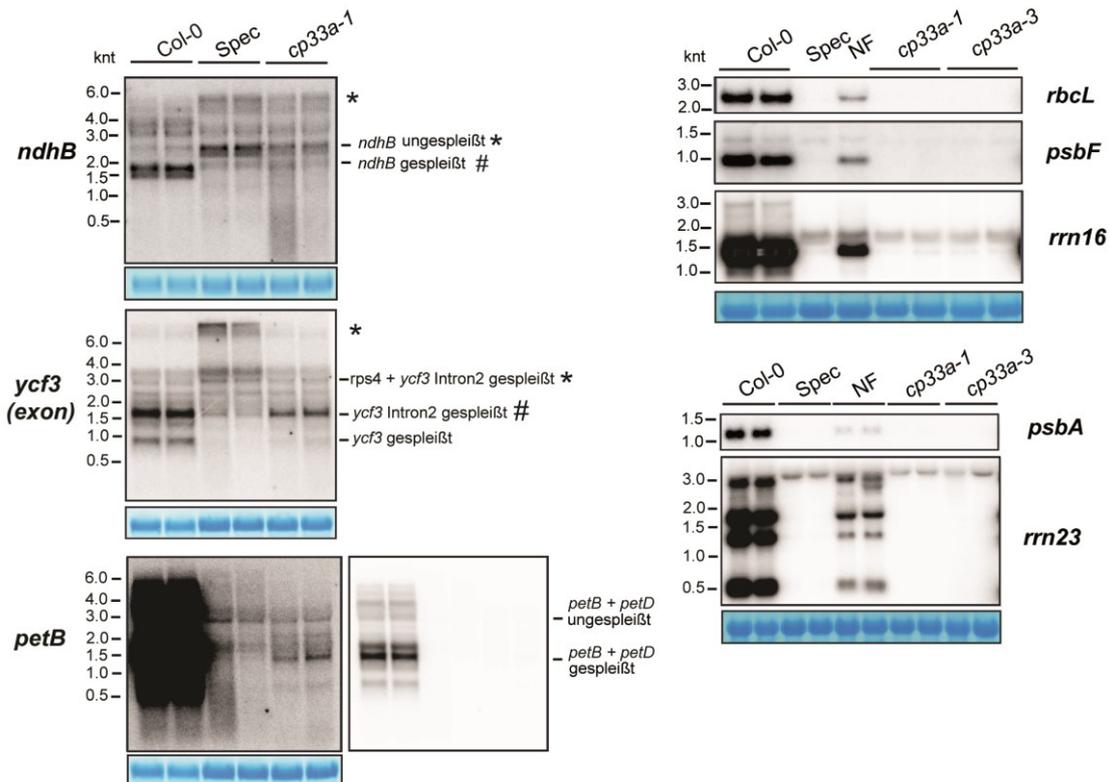


Abb. 13: Starke Reduktion PEP transkribierter Gene in *cp33a*-Nullmutanten

RNA wurde aus Wildtyp (Col-0), Spectinomycin-behandelten Wildtyp (Spec) und *cp33a*-Nullmutanten extrahiert, auf einem 1,2% Agarosegel aufgetrennt und nach der Übertragung auf eine Nylonmembran mit radioaktiv markierten Sonden für plastidäre RNAs hybridisiert (Primersequenzen s. Tabelle 3, Anhang). Bei der Auswahl handelt es sich um Gene die durch die PEP transkribiert werden. Teilweise dienten Wildtyp-Pflanzen die auf Norflurazon-haltigem Medium angezogen wurden als zusätzliche Phänokopie-Kontrollen (NF). Ein Ausschnitt der Methylenblau-Färbung (25S rRNA) wurde als Beladungskontrolle genutzt. Der *petB*-Northern wurde in einer starken und einer schwachen Exposition der gleichen Membran dargestellt. Sterne (*) markieren Vorläufer-Transkripte über 3 knt, welche in Spectinomycin-behandelten Pflanzen gegenüber Wildtyp-Pflanzen stark erhöht sind und in *cp33a*-Mutanten relativ zu Spectinomycin-behandelten Pflanzen reduziert. Raute-Zeichen (#) markieren kürzere bzw. reife Transkripte, die in *cp33a*-Mutanten gegenüber Spectinomycin-behandelten Pflanzen erhöht bzw. in beiden Geweben auf gleichen Niveau sind.

Analysen der Spectinomycin-behandelten Pflanzen stärker reduziert als in den *cp33a*-Pflanzen. Solche Unterschiede könnten auf eine fehlende Strang-Spezifität der qRT-PCR Analyse zurückzuführen sein. So werden in einer qRT-PCR im Gegensatz zu den Northern-Analysen auch antisense-Transkripte gemessen.

Durch die PEP werden ebenfalls die meisten tRNAs abgelesen (Williams-Carrier et al. 2014). Die Transkriptmengen von vier verschiedenen tRNAs wurden untersucht und sind in den *cp33a*-Mutanten und den Antibiotika-behandelten Pflanzen gegenüber dem Wildtyp leicht reduziert (Anhang Abb. 5).

Außerdem wurden einige PEP-abhängige RNAs in der hypomorphen Pflanzenlinie *cp33a-2* analysiert (*rbcL*, *psbA*, *psbF*, *rps14*, *trnA*, Anhang Abb. 6). Insgesamt konnten keine Unterschiede zum Wildtyp detektiert werden. Damit sind 30% der CP33A-Proteinmenge ausreichend um das *steady-state* Level der hier untersuchten RNAs aufrechtzuerhalten.

Ergebnisse

Die in den Northern-Analysen untersuchten NEP-Transkripte sind für die pflanzliche Entwicklung essentiell (Kuroda und Maliga 2003, Kode et al. 2005, Tiller et al. 2012). So wurden mRNAs die für ribosomale Untereinheiten kodieren (*rps2*, *rps8*, *rps15*), eine RNA Polymerase-Untereinheit (*rpoC1*), eine Protease-Untereinheit (*clpP*), eine Acetyl-CoA-Carboxylase Untereinheit (*accD*), eine Untereinheit des Tic-Komplexes (*ycf1*, Kikuchi et al. 2013) und ein noch unbekanntes Protein (*ycf2*) analysiert. Das Transkript-Muster dieser NEP-abhängigen mRNAs ist um einiges komplizierter und differenzierter (Abb. 14) als das Muster der Transkripte, die von der PEP abgelesen werden.

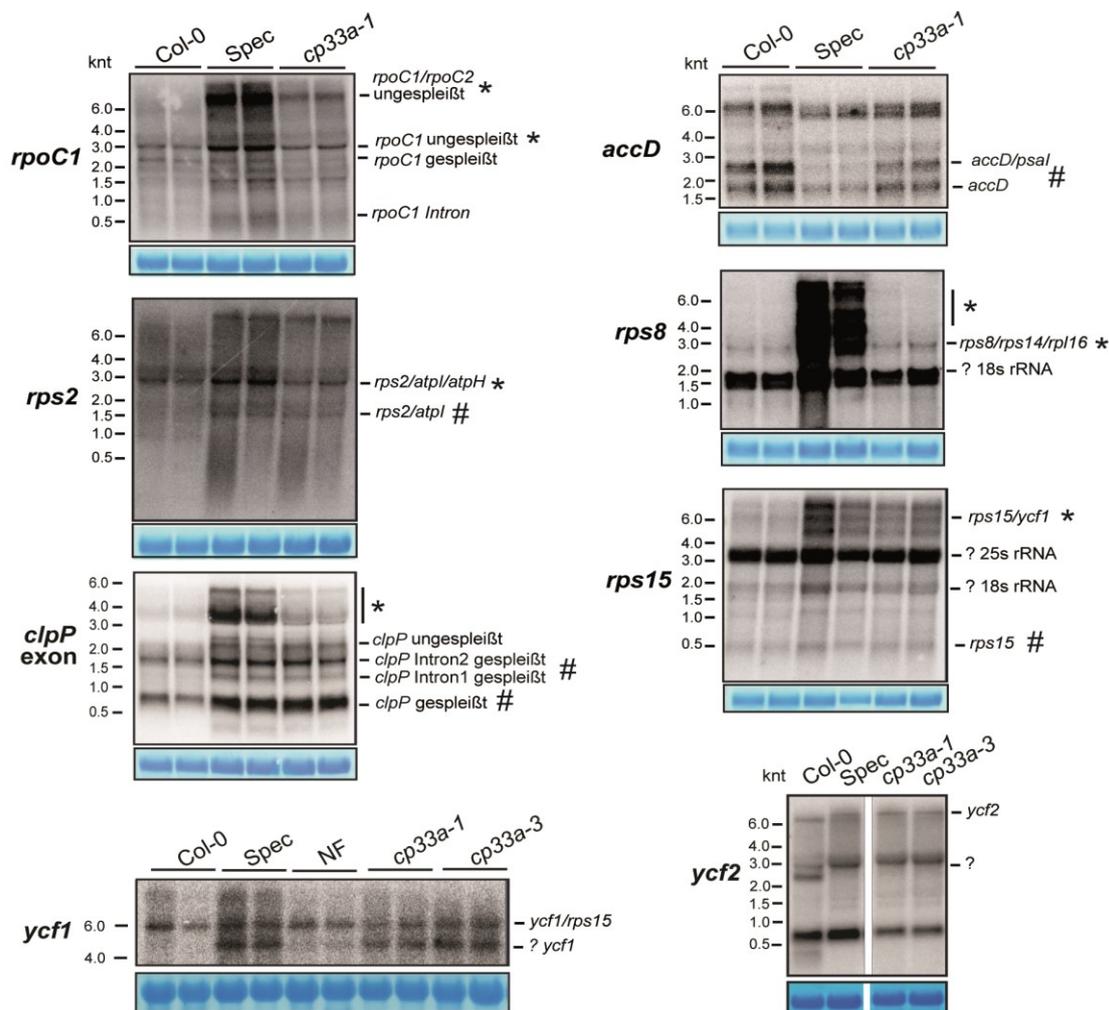


Abb. 14: Analyse NEP transkribierter Gene in *cp33a*-Nullmutanten

RNA wurde aus Wildtyp (Col-0), Spectinomycin-behandeltem Wildtyp (Spec) und *cp33a*-Nullmutanten extrahiert, auf einem 1,2% Agarosegel aufgetrennt und nach der Übertragung auf eine Nylonmembran mit radioaktiv markierten Sonden für plastidäre RNAs hybridisiert (Primersequenzen s. Tabelle 3). Bei der Auswahl handelt es sich um Gene, welche durch die NEP transkribiert werden und essentiell für die Pflanzenentwicklung sind. Teilweise dienten Pflanzen, die auf Norflurazon-haltigem Medium angezogen wurden (NF), als zusätzliche Phänotyp-Kontrolle. Ein Ausschnitt der Methyleneblau-Färbung (25S rRNA) wurde als Beladungskontrolle genutzt. Sterne (*) markieren Vorläufer-Transkripte über 3 knt, welche in Spectinomycin-behandelten Pflanzen gegenüber dem Wildtyp stark erhöht sind und in *cp33a* Mutanten relativ zu Spectinomycin-behandelten Pflanzen reduziert. Raute Zeichen (#) markieren kürzere bzw. reife Transkripte, die in *cp33a*-Mutanten gegenüber Spectinomycin-behandelten Pflanzen erhöht bzw. in beiden Geweben auf gleichen Niveau sind.

Wie bereits in vorherigen Studien belegt, kommt es in albinotischem Gewebe zu einer Steigerung der NEP-Aktivität und infolgedessen zu einer Akkumulation von NEP-Transkripten (Emanuel et al. 2004). Dieses Phänomen ist auch in den Spectinomycin-behandelten Pflanzen zu beobachten. Vor allem längere Fragmente (über 3 knt) zeigen eine Überakkumulation in Spectinomycin-behandelten Pflanzen gegenüber Wildtyp-Pflanzen (*rpoC1*, *rps2*, *rps15*, *rps8* und *clpP*). Zusätzlich akkumulieren auch längere Vorläufer-RNAs von *ycf3* und *ndhB*, welche sowohl durch PEP und NEP transkribiert werden (Abb. 14Abb. 13).

In den *cp33a*-Mutanten kommt es im Vergleich zum Wildtyp ebenfalls zu einer Überexpression von längeren NEP-Transkripten (*rpoC1*, *rps2*, *rps15*, *clpP* und *ndhB*). Diese Überexpression ist jedoch nicht so stark ausgeprägt wie in den Spectinomycin-behandelten Pflanzen. Die meisten langen Transkripte sind in *cp33a*-Mutanten gegenüber Spectinomycin reduziert (*rpoC1*, *rps15*, *clpP*, *ndhB*, *ycf3*, *rps8*, s. Abb. 14 markiert mit Stern) und einige sind auf gleichem Niveau (*rps2*, *ycf2*, *yc1*, *accD*). Besonders stark reduziert sind die Vorläufer-Transkripte von *rps8*, welche in den *cp33a*-Mutanten kaum zu detektieren sind.

Bei kürzeren bzw. reifen Transkripten ist dieser Effekt, der Reduktion im Vergleich zu Spectinomycin-behandelten Pflanzen, nicht mehr zu beobachten. Der Hauptteil der prozessierten Transkripte ist in *cp33a*-Mutanten relativ zu Spectinomycin-behandelten Pflanzen auf gleichem Niveau (*rps15*, *rps2*, *clpP*, *ndhB*) oder sogar erhöht (*ycf3*, *accD*, Abb. 14 markiert mit Raute). Lediglich die gespleißte *rpoC1* mRNA ist in Spectinomycin-behandelten Pflanzen gegenüber *cp33a*-Mutanten minimal stärker exprimiert.

Die Transkriptmengen für *ycf1* und *ycf2* zeigen in den Northern-Analysen keine großen Unterschiede zwischen den drei verschiedenen Gewebetypen. Jedoch werden in den *cp33a*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp Transkripte mit veränderten Größen detektiert. Da diese Transkripte auch in den Spectinomycin-behandelten Pflanzen auftauchen, scheint es sich hierbei um keinen primären Defekt der CP33A-Deletion, sondern eher um einen sekundären Effekt der verminderten PEP-Expression zu handeln.

Insgesamt liegt in den *cp33a*-Mutanten ein starker Verlust von PEP-transkribierten RNAs vor. Die erwartete Überexpression von NEP-transkribierten Genen ist wesentlich schwächer als im albinotischen Kontroll-Gewebe. Vor allem längerer Vorläufer-RNAs sind in den *cp33a*-Mutanten reduziert.

3.4.3.3 Destabilisierung ungespleißter Transkripte in *cp33a*-Nullmutanten

In Mutanten der cpRNPs CP31A und CP29A aus *Arabidopsis* kommt es unter Kälte-Einwirkung zu Spleiß-Defekten einiger mRNAs (Kupsch et al. 2012). Um eine mögliche Beteiligung von CP33A beim Spleißen von plastidären Transkripten zu untersuchen, wurden qRT-PCR Analysen aller Intron-haltigen Transkripte durchgeführt. Die in den PCR-Ansätzen verwendeten Primerpaare (Sequenzen s. Tabelle 3, Anhang) wurden speziell für diesen Zweck in einer früheren Studien entwickelt (de Longevialle et al. 2008) und ermöglichen die getrennte Ermittlung der Transkriptmengen von gespleißten und den dazugehörigen ungespleißten mRNAs. Neben der Analyse von 14 Tage alten Wildtyp-Pflanzen und Pflanzen der *cp33a-1* Linie, dienen auch diesmal als Phänotyp-Kontrollen Wildtyp-Pflanzen die auf Spectinomycin-haltigem Medium angezogen wurden.

Die relativen Transkriptmengen der gespleißten und ungespleißten mRNAs beider Gewebetypen sind als Quotienten zu den Transkriptmengen des Wildtyps separat in zwei Diagrammen dargestellt (Abb. 15A, B). Spectinomycin-behandelte Wildtyp-Pflanzen und *cp33a*-Mutanten zeigen ähnliche Veränderungen in den Transkriptmengen der gespleißten mRNAs (Ausnahme *rpoCl1*). Demnach weisen 8 von 12 gespleißten Transkripten keine starken Veränderungen gegenüber dem Wildtyp auf und vier mRNAs (*atpF*, *ycf3* (Intron 2), *petB* und *petD*) sind in beiden Gewebetypen stark reduziert (Abb. 15A). Die Akkumulation der ungespleißten Transkripte unterscheidet sich im Gegensatz dazu recht stark zwischen Spectinomycin-behandelten Pflanzen und *cp33a*-Mutanten (Abb. 15B). 9 von 12 untersuchten mRNAs überakkumulieren in den Spectinomycin-behandelten Pflanzen gegenüber dem Wildtyp. Die restlichen drei mRNAs (*atpF*, *petB* und *petD*) sind auf Wildtyp-Niveau. In den *cp33a*-Mutanten weisen dagegen nur *rps12* (Intron2), *clpP* und *rpl2* eine Anreicherung der ungespleißten Transkripte gegenüber dem Wildtyp auf. Die restlichen mRNAs sind entweder reduziert oder auf Wildtyp-Niveau. Insgesamt sind aber alle analysierten ungespleißten Transkripte in den *cp33a*-Mutanten um das zwei bis vierfache gegenüber den Spectinomycin-behandelten Pflanzen reduziert. Offensichtlich führt der Verlust von CP33A zu einer Destabilisierung von ungespleißten mRNAs. Dies bestätigt die Northern-Analysen, in denen eine Destabilisierung längerer Vorläufer-Transkripte zu beobachten war (s. Kapitel 0 und Abb. 14), zu denen auch die ungespleißten mRNAs zählen.

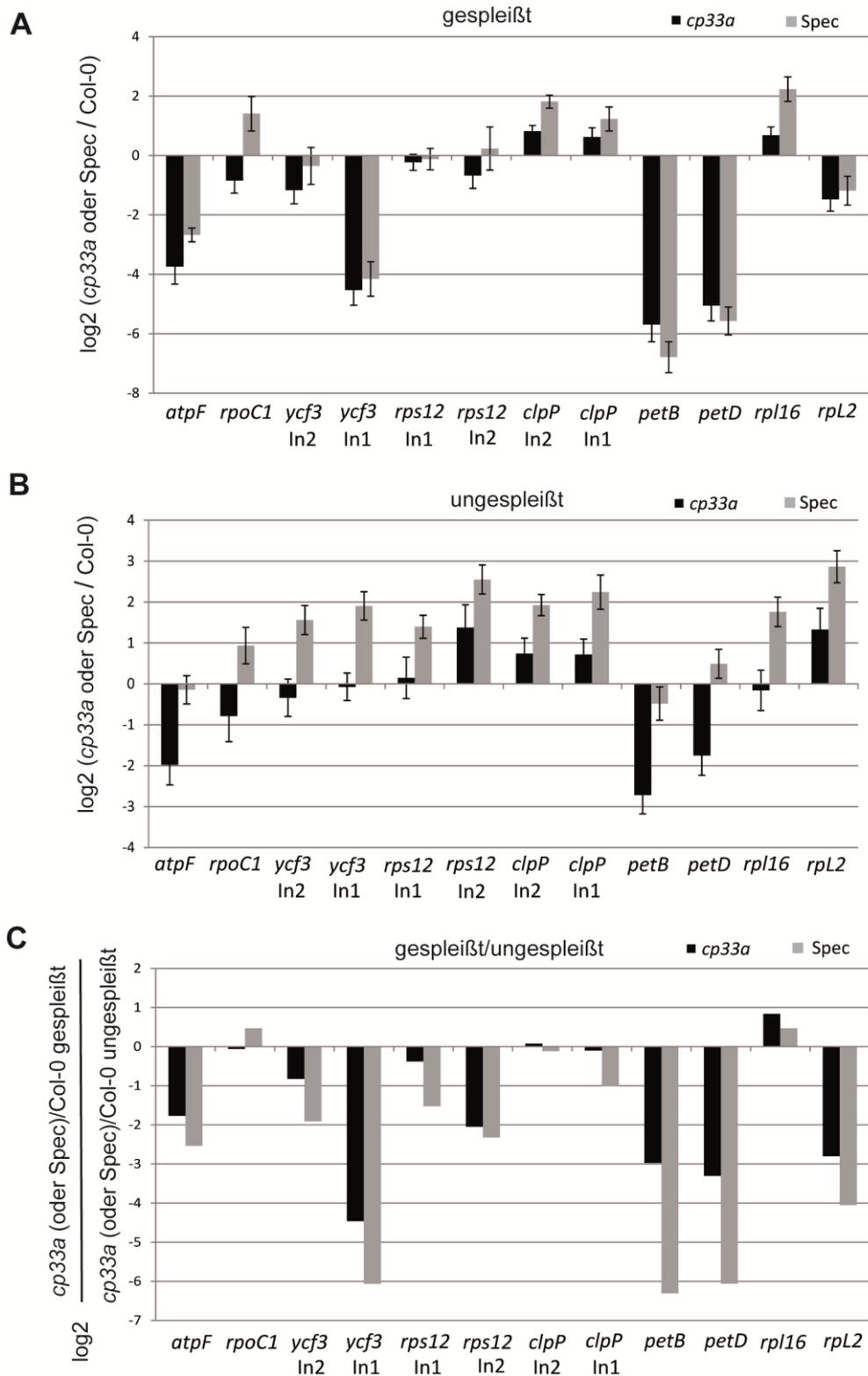


Abb. 15: Depletion von CP33A führt zur Reduktion ungespleißter Transkripte

Quantitative Real-time (qRT)-PCR wurde genutzt um die Transkriptmengen von gespleißten und ungespleißten mRNAs in 14 Tage alten Wildtyp, Spectinomycin-behandelten Wildtyp-Pflanzen und *cp33a-1* Mutanten zu ermitteln. Es wurden jeweils zwei biologische Replikate untersucht. Die Messung der *Actin*-mRNA diente zur Normalisierung der relativen RNA-Konzentrationen. Log₂ Quotienten von gespleißten (A) und ungespleißten Introns (B) in *cp33a-1* und Spectinomycin-behandelten Pflanzen gegenüber dem Wildtyp. (C) Log₂ Quotient aus gespleißter zu ungespleißter mRNA. (komplette Daten siehe Teubner et al. 2017). Abkürzung: In1, In2 = Intron1, Intron2.

Ein typischer Spleißdefekt führt zu einer Reduktion der gespleißten Transkripte und einer Akkumulation der ungespleißten mRNAs. Über die Bildung des Quotienten aus gespleißt/ungespleißt, welcher auch als Spleißeffizienz betitelt wird, lässt sich daher ein möglicher Spleißdefekt erkennen (de Longevialle et al. 2008). Die Spleißeffizienz ist in den Spectinomycin-behandelten Wildtyp- und *cp33a*-Pflanzen gegenüber dem Wildtyp für die meisten Transkripte reduziert (Abb. 15C). Ausnahmen bilden die mRNAs *rpoC1*, *clpP* und *rpl16*. Offensichtlich führt die Hemmung der plastidären Translation, wie sie in den Spectinomycin-behandelten Pflanzen vorliegt, sekundär zu einem Spleißdefekt bestimmter mRNAs (*atpF*, *ycf3*, *petB*, *petD* und *rpl2*). Die Spleißeffizienz der *cp33a*-Pflanzen ist in den meisten Fällen (Ausnahme *rpoC1*) gegenüber den Spectinomycin-behandelten Pflanzen stärker reduziert. Dies zeigen auch die Northern-Analysen von *petB* und *ycf3* (Abb. 13). Damit handelt es sich in den *cp33a*-Mutanten sehr wahrscheinlich ebenfalls um sekundäre Effekte, die zu einer reduzierten Spleißeffizienz führen.

3.5 CP33A interagiert mit freien RNAs

Wie bereits in dieser Studie belegt, assoziiert CP33A nicht mit Polysomen und ist somit kein konstitutiver Bestandteil der Ribosomen (Kapitel 3.3, Abb. 9). Da CP33A mit nahezu allen mRNAs interagiert (Abb. 7), könnte eine mögliche Funktion von CP33A darin liegen, dass es RNAs, die gerade nicht translatiert werden, vor ihrem Abbau schützt. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde lysiertes Pflanzenmaterial mit und ohne Puromycin (0,5 mg/ml) behandelt. Puromycin ist ein Antibiotikum welches eine verfrühte Termination der Translation einleitet, wodurch es zur Freisetzung von Ribosomen gebundenen RNAs kommt (Anhang Abb. 7 und Margulies and Michaels, 1974). Durch eine klassische RIP-Chip-Analyse sollte anschließend überprüft werden, ob CP33A mit den freigelassenen RNAs nach einer Puromycin-Behandlung interagiert. Als Kontrolle dient eine Immunopräzipitation mit IgG auf Wildtyp-Gewebe, welches ohne Puromycin behandelt wurde. Eine Western-Analyse der verschiedenen Präzipitat- und Überstands-Fractionen zeigt, dass CP33A in beiden Gewebetypen (mit und ohne Puromycin) erfolgreich präzipitiert wird, wohingegen kein Signal für CP33A im Präzipitat der IP mit IgG detektierbar ist (Abb. 16A). Die Immunopräzipitation von CP33A aus Gesamtpflanzenextrakten ist jedoch nicht so effizient wie CP33A-IPs aus Stroma-Fractionen (vergleiche Abb. 6A).

Die Auswertung der RIP-Chip-Daten erfolgte wie in Kap. 3.2 beschrieben. Von jedem der drei verschiedenen Immunopräzipitationen wurden zwei biologische Replikate durchgeführt.

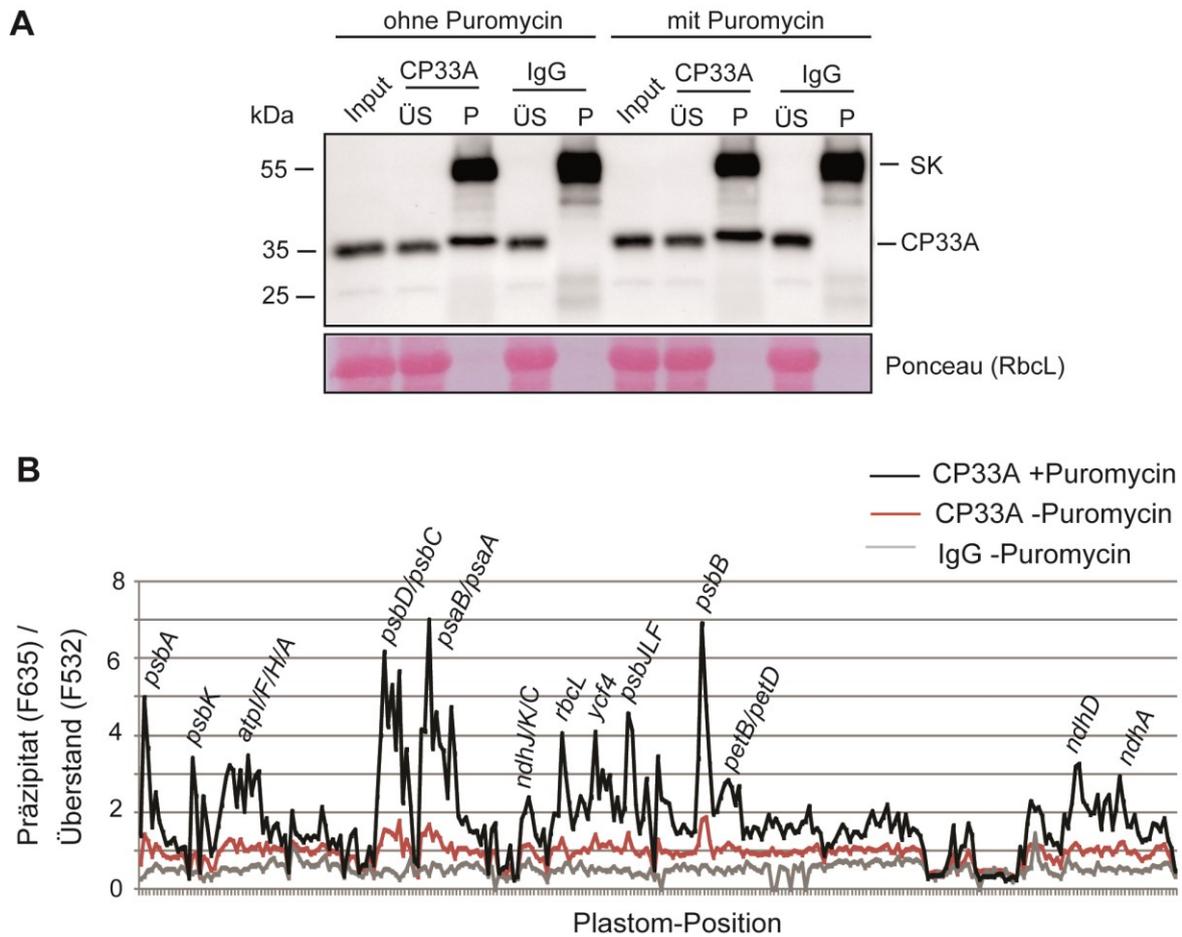


Abb. 16: Stärkere RNA-Anreicherung in CP33A-IPs nach Puromycin Behandlung von Pflanzenextrakten

(A) Lysierte Pflanzenextrakte wurden mit und ohne Puromycin (0,5 mg/ml) behandelt und anschließend für Immunpräzipitationen entweder mit anti-CP33A (Peptid b) oder als Kontrolle mit IgG genutzt. 1/200 der Überstand (ÜS)- und 1/13 der Präzipitat-Fractionen (P), sowie ein Teil der für die IP verwendeten Pflanzenextrakte (Input) wurden immunologisch mit anti-CP33A (Peptid a) untersucht. SK markiert die schwere Kette des Antikörpers. Ein Ausschnitt der Ponceaufärbung, welche RbcL zeigt, diente als Ladungsvergleich. Die Analyse wurde einmal mit gleichem Ergebnis wiederholt. (B) Verhältnisse der Fluoreszenzsignale aus kopräzipitierter RNA (F635) und ungebundener RNA (F532) aufgetragen gegen die Position auf dem Chloroplastengenom. Jeweils zwei biologische Replikate von drei der vier verschiedenen Immunpräzipitationen aus (A) wurden verwendet: CP33A-IP mit und ohne Puromycin und als Kontrolle Immunpräzipitationen mit IgG auf Gewebe ohne Puromycin. Die Präzipitat/Überstand Verhältnisse (Median (*Median of Ratios*)) wurden auf die Summe der Medianwerte der ribosomalen RNAs der Überstände (Median F532) normalisiert (Daten in Tabelle 5, Anhang). Gekennzeichnet im Diagramm sind Transkripte mit den höchsten Anreicherungs-werten.

Normalisiert wurde auf die Summe der Medianwerte der ribosomalen RNAs der Überstand-Fractionen, da die rRNAs laut den Ergebnissen des Stroma RIP-Chips keine bzw. sehr schwache Ziel-RNAs von CP33A darstellen. Die Verhältnisse aus Präzipitat und Überstand wurden entsprechend ihrer Position auf dem Chloroplastengenom in einem Diagramm aufgetragen (Abb. 16B). Die Anreicherungskurven der CP33A-Immunpräzipitationen mit und ohne Puromycin verlaufen jeweils oberhalb der IgG-Kontrollkurve. Wobei insgesamt mit CP33A mehr RNA in den Fractionen „mit Puromycin“ assoziiert als in den Fractionen „ohne Puromycin“.

Die Transkripte mit den höchsten Anreicherungen (*psbD/psbC*; *psaB*, *psbJ/L/F* und *psbB*) sind identisch mit denen aus den RIP-Chip-Analysen mit Stroma-Material. Bei der Immunopräzipitation aus Pflanzenmaterial (ohne Puromycin) scheint jedoch insgesamt weniger RNA angereichert zu sein im Vergleich zu den IPs aus Stroma-Material. So ist die Mehrheit der Transkripte bei einer Immunopräzipitation aus Stroma im Vergleich zur Kontrolle um das Zwei- bis Zehnfache erhöht und bei einer IP aus Pflanzenmaterial (ohne Puromycin) nur um das Ein- bis Zweifache zur Kontrolle erhöht (vergleiche Abb. 7 und rote Kurve in Abb. 16B). Ein möglicher Grund dafür könnte die ineffizientere CP33A-Immunopräzipitation sein (Abb. 16A).

Insgesamt führt die Behandlung von Pflanzenextrakten mit Puromycin zu einer verstärkten RNA-Assoziation mit CP33A im Vergleich zu unbehandelten Proben. Es scheint, dass die freigewordenen RNAs mit CP33A interagieren.

3.6 Analyse der *cp33b*-Nullmutanten

3.6.1 Der Knockout von CP33B führt zu keinen makroskopischen Defekten

Um die Funktion von CP33B innerhalb des plastidären RNA-Metabolismus weiter zu entschlüsseln, wurde ebenfalls ein revers-genetischer Ansatz benutzt. Dafür wurden drei verschiedene T-DNA-Insertionslinien mittels PCR auf ihre T-DNA-Insertion untersucht (Anhang Abb. 8; Primersequenzen in Anhang Tabelle 3) und anschließend durch Sequenzierungen verifiziert. Die T-DNAs der Linie *cp33b-1* (SALK_068298) und *cp33b-4* (SK31607) lokalisieren beide innerhalb des Leserahmens von CP33B, im 4. Exon (*cp33b-1*) bzw. im 1. Exon (*cp33b-4*). Dagegen handelt es sich bei der T-DNA der *cp33b-3* (GK-044F06) Linie um eine Insertion stromaufwärts des Leserahmens innerhalb der 5'UTR (Abb. 17A). Homozygote Pflanzen wurden für alle drei T-DNA-Insertionslinien mittels PCR identifiziert und propagiert (Anhang Abb. 8). Keine der Linien zeigt unter Standardbedingungen einen vom Wildtyp abweichenden Phänotyp (Abb. 17C). Mittels Western-Analysen wurde die CP33B-Expression in Gesamtproteinextrakten der einzelnen T-DNA-Linien durch die Verwendung eines CP33B spezifischen Antikörpers untersucht (Abb. 17B). In den *cp33b-1*- und *cp33b-3*-Linien ist die CP33B-Proteinmenge reduziert. Dagegen kann man in den homozygoten *cp33b-4* Pflanzen kein Signal auf Höhe von CP33B (33,8 kDa) detektieren. Zudem weisen heterozygote *cp33b-4* Pflanzen verringerte CP33B-Proteinmengen auf.

Auch in den Präzipitaten der CP33B-IPs mit *cp33b-4*-Stroma-Material ist kein Signal für CP33B detektierbar (Abb. 6). Diese fehlenden Proteinsignale für CP33B sowie die T-DNA-Lokalisation der *cp33b-4* Linie im 1. Exon deuten darauf hin, dass es sich bei der *cp33b-4* Linie um eine Knockout-Linie von CP33B handelt. Der Verlust von CP33B führt damit unter Standardwachstumsbedingungen zu keinen makroskopischen Defekten (Abb. 17C).

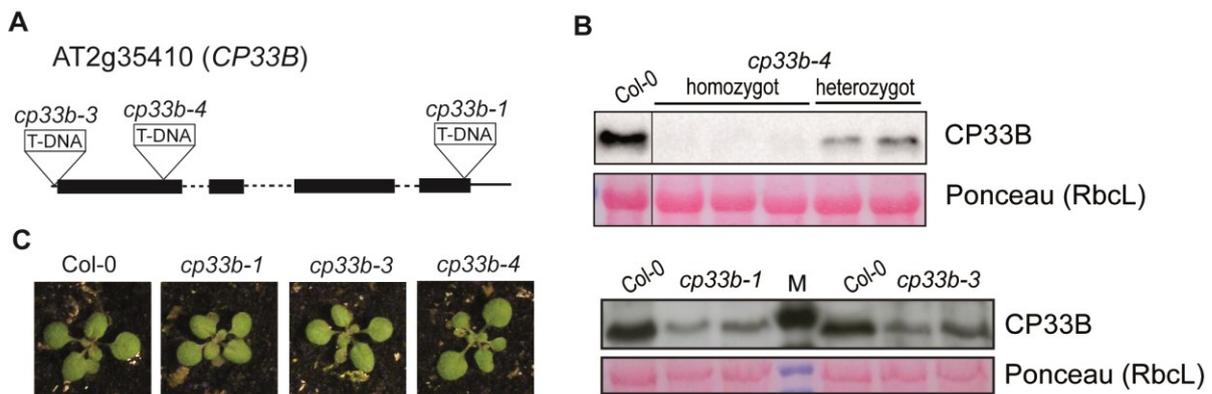


Abb. 17: Isolierung von *cp33b*-Nullmutanten

(A) Genkarte von *CP33B* (AT2g35410), bestehend aus 4 Exons (schwarze Balken) und drei Introns (gestrichelte Linie). Die Lokalisation der T-DNA-Insertionen von drei verschiedenen Pflanzenlinien sind gekennzeichnet, *cp33b-1* (SALK_068298), *cp33b-3* (GK-044F06), und *cp33b-4* (SK31607). (B) Immunologische Untersuchung mit anti-CP33B von Gesamtproteinextrakten von Wildtyp (Col-0), homozygoten und heterozygoten Pflanzen der *cp33b-4*-Linie (oberes Bild) bzw. homozygoter Pflanzen der *cp33b-1* und *cp33b-3*-Linien (unteres Bild). Innerhalb einer Western-Analyse wurden gleiche Proteinmengen per SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Ein Ausschnitt der Ponceaufärbung ist gezeigt (RbcL). Die Analysen wurden mit mehreren biologischen Replikaten und mit gleichem Ergebnis wiederholt. (C) Phänotyp von 16 Tage alten Wildtyp (Col-0) und homozygoten Pflanzen der Linien *cp33b-1*, *cp33b-3* und *cp33b-4*. Pflanzen wuchsen auf Erde unter Standardbedingungen.

3.6.2 Kein veränderter Phänotyp der *cp33b*-Mutanten unter Licht- und Kälte-Stress

Die bisher untersuchten Arabidopsis cpRNP-Mutanten wiesen unter Standardwachstumsbedingungen (23°C, 120 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$, 16h Licht, 8h Dunkelheit) keine makroskopischen Defekte auf (Tillich et al. 2009, Kupsch et al. 2012). Jedoch sind CP31A und CP29A wichtige Faktoren für die Kältetoleranz in jungem Gewebe. Werden *cp31a*- und *cp29a*-Nullmutanten in Kälte (8°C) angezogen, kommt es zum Ausbleichen des jungen Gewebes und einem verminderten Wachstum gegenüber dem Wildtyp (Kupsch et al. 2012). Um eine mögliche Beteiligung von CP33B in der Kältetoleranz zu prüfen, wurde das Wachstum der CP33B-Knockout-Linie in Kälte untersucht. Hierfür wurden *cp33b-4*-Pflanzen parallel mit Wildtyp und *cp31a*- und *cp29a*-Mutanten entweder direkt in Kälte (8°C) angezogen bzw. nach 18 Tagen Wachstum unter Standardbedingungen (23°C) in die Kälte transferiert. Während *cp31a* und *cp29a*-Nullmutanten einen Kältephänotyp entwickelten, zeigen die *cp33b-4* Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp keinen veränderten Phänotyp (Daten nicht gezeigt).

Ergebnisse

Zusätzlich wurde das Wachstum der *cp33b*-Nullmutanten unter verschiedenen Lichtbedingungen untersucht. Wie bereits gezeigt (s. Kapitel 3.2.3), interagiert CP33B im Stroma mit dem Hauptteil der *psbA*-Transkripte. Die *psbA* mRNA kodiert für das 32-kDa große D1-Protein, einen Bestandteil des Reaktionszentrums des Photosystem II. Typisch für das D1-Protein ist seine Lichtempfindlichkeit und hohen *turnover*-Raten. Durch Photooxidation geschädigtes D1 wird abgebaut und schnell durch den Einbau von neu synthetisierten D1-Proteins wieder ersetzt. (zusammengefasst in Theis und Schroda 2016). Da CP33B ein möglicher Regulator der *psbA* Genexpression ist, könnte dessen Knockout zu einem lichtempfindlichen Phänotyp führen. Um dies zu testen, wurden *cp33b-4* Pflanzen parallel mit Wildtyp-Pflanzen unter drei verschiedenen Lichtbedingungen (Starklicht (1000 μ E und 600 μ E) sowie Schwachlicht (20 μ E)) angezogen. In einem ersten Versuch wurden Samen der *cp33b*-Nullmutanten und Wildtyp-Pflanzen direkt unter den 3 verschiedenen Lichtbedingungen ausgesät und deren Wachstum für 28 Tage beobachtet. In einem zweiten Versuch erfolgte die Anzucht der zwei Genotypen unter Standardbedingungen und nach 16 Tagen wurden die Pflanzen den drei verschiedenen Lichtbedingungen ausgesetzt. In keinen der beiden Versuche zeigt sich ein makroskopischer Unterschied zwischen den *cp33b*-Nullmutanten und den Wildtyp-Pflanzen (Daten nicht gezeigt).

Der hier durchgeführte Lichtstress war konstant, was jedoch nicht den natürlichen Umweltbedingungen entspricht. In der Natur können sich Lichtintensitäten durch natürliche Beschattung (Wolken, andere Vegetation etc.) innerhalb von Sekunden ändern. Mutanten der chloroplastidären Proteine PGR5 und STN7 zeigen unter fluktuierenden Lichtbedingungen einen letalen Phänotyp bzw. ein vermindertes Wachstum. PGR5 (Proton Gradient Regulation 5) spielt eine Rolle im zyklischen Elektronenfluss (*cyclic electron flow* (CET)) (Tikkanen et al. 2010) und reguliert den Elektronfluss während plötzlicher Lichtveränderungen. Ein anderer Schutz-Mechanismus bei schnellen Lichtänderungen wird durch STN7 gewährleistet. Die STN7-Kinase ist verantwortlich für die Phosphorylierung der LHCII (*light-harvesting complex II*) Proteine. Deren Phosphorylierung ist wichtig für den funktionellen Ausgleich des Elektronentransports zwischen PSII und PSI. (Grieco et al, 2012). Um eine mögliche Beteiligung von CP33B bei der Anpassung an wechselnde Lichtbedingungen zu untersuchen, wurden *cp33b-4* Pflanzen parallel mit Wildtyp-Pflanzen unter fluktuierenden Lichtbedingungen (im Wechsel 5min 50-60 μ mol/m²s und 1min 500-550 μ mol/m²s) angezogen. Jedoch zeigt sich auch nach 4 Wochen Anzucht kein phänotypischer Unterschied zwischen den *cp33b*-Nullmutanten und den Wildtyp-Pflanzen (Daten nicht gezeigt).

3.6.3 In *cp33b*-Nullmutanten sind die Proteinmengen einiger photosynthetischer Proteine leicht reduziert

Bisher weisen *cp33b-4* Pflanzen gegenüber dem Wildtyp unter verschiedenen Wachstumsbedingungen keinen veränderten Phänotyp auf (s. Kapitel 3.6.1 und 3.6.2), dies schließt Veränderungen auf molekularer Ebene jedoch nicht aus. Da CP33B mit einer Vielzahl an chloroplastidären mRNAs interagiert (s. Abb. 8), ist ein Einfluss von CP33B auf die Expression dieser mRNAs vorstellbar. Immunologische Untersuchungen von verschiedenen chloroplastidären Proteinen sollten mögliche Veränderungen auf Proteinebene in *cp33b*-Mutanten aufdecken. Es wurden Gesamtproteinextrakte von Wildtyp und *cp33b*-Mutanten isoliert, und die Akkumulation ausgesuchter Untereinheiten der Photosynthese-Maschinerie vom Photosystem I (PsaD), von Photosystem II (PsbP), der ATP-Synthase (AtpA), des Cytochrom-*b6f*-Komplexes (PetD), des NDH-Komplexes (NdhH), sowie der großen Untereinheit von RuBisCO (RbcL) analysiert. Zusätzlich wurde als Ladungskontrolle das mitochondriale CoxII (Cytochrom Oxidase II) bzw. das cytosolische Hsp70 (Hitzeschockprotein 70) immunologisch detektiert (Abb. 18). Die Proteinsignale wurden mittels der Image Lab Software (Bio-Rad) quantifiziert, auf die Signalstärke von CoxII bzw.

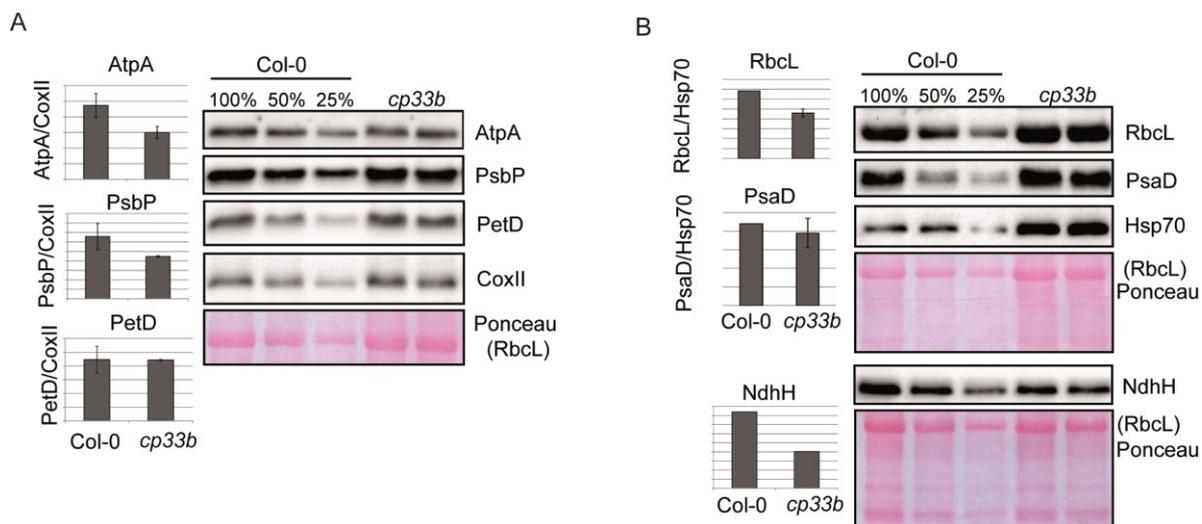


Abb. 18: Reduktion der Proteinmengen von AtpA, PsbP, RbcL und NdhH in *cp33b*-Nullmutanten
 Immunologischer Nachweis verschiedener Untereinheiten photosynthetischer Proteine (Photosystem I (PsaD), Photosystem II (PsbP), ATP-Synthase (AtpA), Cytochrom-*b6f*-Komplexes (PetD), NDH-Komplexes (NdhD) sowie der großen Untereinheit von RuBisCO (RbcL)) in Gesamtproteinextrakten 14 Tage alter Wildtyp und *cp33b*-Mutanten Pflanzen. Von den Wildtypextrakten wurden drei verschiedene Verdünnungen und von der *cp33b*-Mutante zweimal 100% Gesamtproteinextrakt durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembranen transferiert. Die Detektion von CoxII bzw. Hsp70 dienen als Beladungskontrollen. Chemolumineszenz-Signale wurden mit der Image Lab Software (Bio-Rad) quantifiziert, auf das CoxII- bzw. Hsp70-Signal normalisiert und gemittelt (s. Balkendiagramme neben Abbildungen). Im Fall von Hsp70 wurde ausschließlich das Signal von Col-0 50% zur Normalisierung verwendet, aufgrund ungleichmäßiger Signale der anderen Verdünnungen. Die Signalstärken für NdhH wurden ohne Normalisierung dargestellt, da kein Kontrollprotein detektiert wurde. Als Beladungskontrolle dient hier ein großer Ausschnitt der Ponceaufärbung, aufgrund einer möglichen Reduktion von RbcL.

Ergebnisse

Hsp70 normalisiert und als Mittelwerte in einem Diagramm dargestellt. Für die Western-Analyse von NdhH fehlt eine Ladungskontrolle. Hier dient zur Überprüfung der gleichmäßigen Beladung die Ponceaufärbung (Abb. 18B).

Die Proteine PetD und PsaD akkumulieren zu ungefähr gleichen Anteilen in den Wildtyp und den Mutanten-Pflanzen. Dagegen weisen AtpA (~30% reduziert), PsbP (~20% reduziert), RbcL (~30% reduziert) und NdhH eine Reduktion in den *cp33b*-Mutanten gegenüber dem Wildtyp auf. Eine Aussage über die Signifikanz dieser Unterschiede lässt sich bei zwei biologischen Replikaten nicht treffen, dafür wären weitere Untersuchungen nötig.

Da CP33B mit dem Großteil der *psbA* mRNA, welche für das D1-Protein kodiert, interagiert (s. Abb. 8), ist die Untersuchung der D1-Proteinmenge in den *cp33b*-Mutanten von besonderem Interesse. Für die Western-Analysen wurden Gesamtproteinextrakte von Wildtyp und *cp33b*-Nullmutanten zusätzlich in lösliche und unlösliche Proteinbestandteile getrennt. Als Beladungskontrolle dient der immunologische Nachweis des Hsp70-Proteins. Der Quotient der relativen Proteinmenge von D1 und Hsp70 ist in einem Diagramm dargestellt (Abb. 19). Insgesamt lässt sich kein Unterschied zwischen den Gesamtproteinfraktionen in *cp33b*-Mutanten und Wildtyp nachweisen. Da sich das D1 Protein in den Thylakoidmembranen der Chloroplasten befindet, wird es vor allem in den unlöslichen Proteinfraktionen detektiert. Es zeigen sich zwar Unterschiede der D1-Proteinmengen in den Membranen (= unlösliche Fraktion) und der löslichen Fraktion zwischen Wildtyp und *cp33b*-Mutante, nach der Bildung der Summe beider Fraktionen ergeben sich aber annähernd gleiche D1-Proteinmengen.

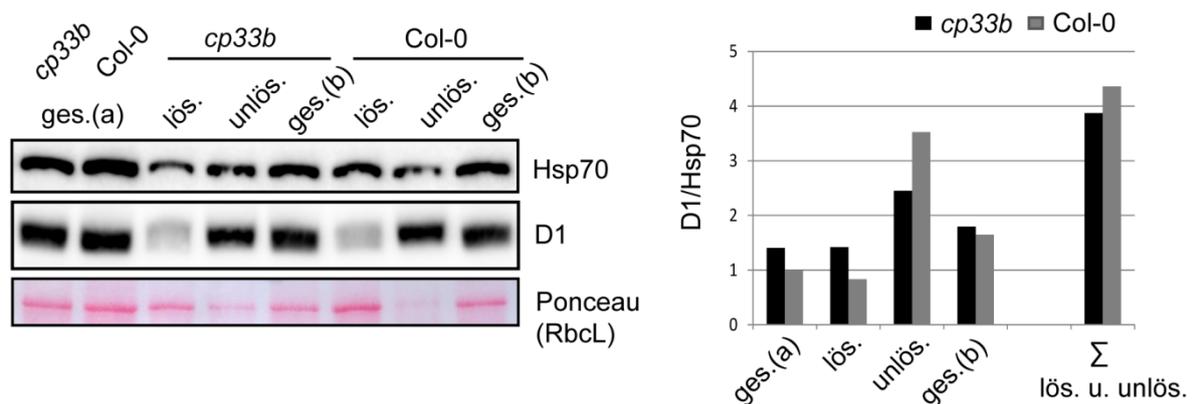


Abb. 19: Gesamtproteinmenge von D1 ist in *cp33b*-Nullmutanten unverändert

D1 wurde immunologisch in Gesamtproteinextrakten von Wildtyp und *cp33b*-Mutanten aus zwei biologischen Replikaten (ges.(a) und ges.(b)) nachgewiesen, sowie in der löslichen (lös.) und unlöslichen (unlös.) Fraktion von dem zuvor aufgetrennten Gesamtproteinextrakt (b). Die Detektion von Hsp70 dient als Beladungskontrolle. Signale wurden mit der Image Lab Software (Bio-Rad) quantifiziert und auf das Hsp70 Signal normalisiert (siehe Balkendiagramme rechts). Zusätzlich wurde die Summe der relativen D1-Proteinmenge aus löslicher und unlöslicher Fraktion von jeweils *cp33b*-Mutante und Wildtyp berechnet und auch im Diagramm dargestellt.

Wie bereits erwähnt (Kapitel 3.6.2) handelt es sich bei D1 um ein besonders lichtempfindliches Protein, daher wurden dessen Proteinmengen zusätzlich auch unter verschiedenen Lichtintensitäten (Starklicht (1000 μ E und 600 μ E) oder Schwachlicht (20 μ E)) getestet. Der Verlust von CP33B führt weder unter Schwach- noch unter Starklichtbedingungen zu einer Reduktion der Proteinmenge von D1 (Anhang Abb. 9). Da die Westernanalyse somit kein Unterschied aufzeigt, wurde dieser einmalige Versuch nicht wiederholt. Insgesamt lassen sich für einige photosynthetische Proteine Veränderungen in den Proteinakkumulationen zwischen *cp33b*-Nullmutante und Wildtyp feststellen. Der Unterschied liegt dabei nie mehr als über 30%. Weitere Western-Analysen mit mehreren biologischen Replikaten sind nötig, um die tatsächliche Signifikanz dieser Unterschiede zu ermitteln.

3.6.4 Plastidäre Transkriptmengen sind in *cp33b*-Nullmutanten nur unwesentlich verändert

Vorherige Studien konnten bereits belegen, dass cpRNPs chloroplastidäre RNAs sowohl *in vitro* (Nakamura et al. 2001) als auch *in vivo* (Tillich et al. 2009, Kupsch et al. 2012) stabilisieren können. Da CP33B vor allem mit *psbA* interagiert, wurde dessen Transkriptmengen mittels Northern-Analysen in Blattgeweben verschiedenen Alters untersucht. Daneben erfolgte die Analyse von zwei weiteren CP33B Ziel-RNAs, *atpH* und *psaC* (Abb. 20). Die Transkript-Akkumulation von *atpH*, *psaC* und *psbA* in 7 Tage und 14 Tage alten Wildtyp und *cp33b*-Nullmutanten weisen keinen Unterschied zwischen den zwei Gewebetypen auf. Zusätzlich wurden noch weitere Altersstufen (3 Tage bis 30 Tage) in Northern-Analysen für *psbA* untersucht. Da die Beladung zwischen Wildtyp und Mutante sehr ungleichmäßig war (s. Methylenblaufärbung in Abb. 20) dient die Hybridisierung mit einer RNA-Sonde gegen *tRNA-A*, zur Normalisierung. *trnA* zeigt im RIP-Chip mit CP33B keine bzw. eine sehr geringe Assoziation und ist daher sehr wahrscheinlich keine Ziel-RNA von CP33B. Die Signalstärken der einzelnen Banden wurden mittels der Quantity-One-Software (Bio-Rad) ermittelt. Die Quotienten aus den Signalstärken von *psbA* zu *trnA* sind in einem Diagramm aufgetragen. Demnach kommt es in den Mutanten in jungem (3d) und altem (30d) Gewebe zu einer Reduktion der Transkripte relativ zum Wildtyp. Dagegen ist in 7 Tage alten Pflanzen die *psbA* mRNA in der *cp33b*-Mutante gegenüber dem Wildtyp erhöht. In den Altersstufen 14d, 18d und 24d sind die Transkriptmengen in beiden Gewebetypen annähernd gleich.

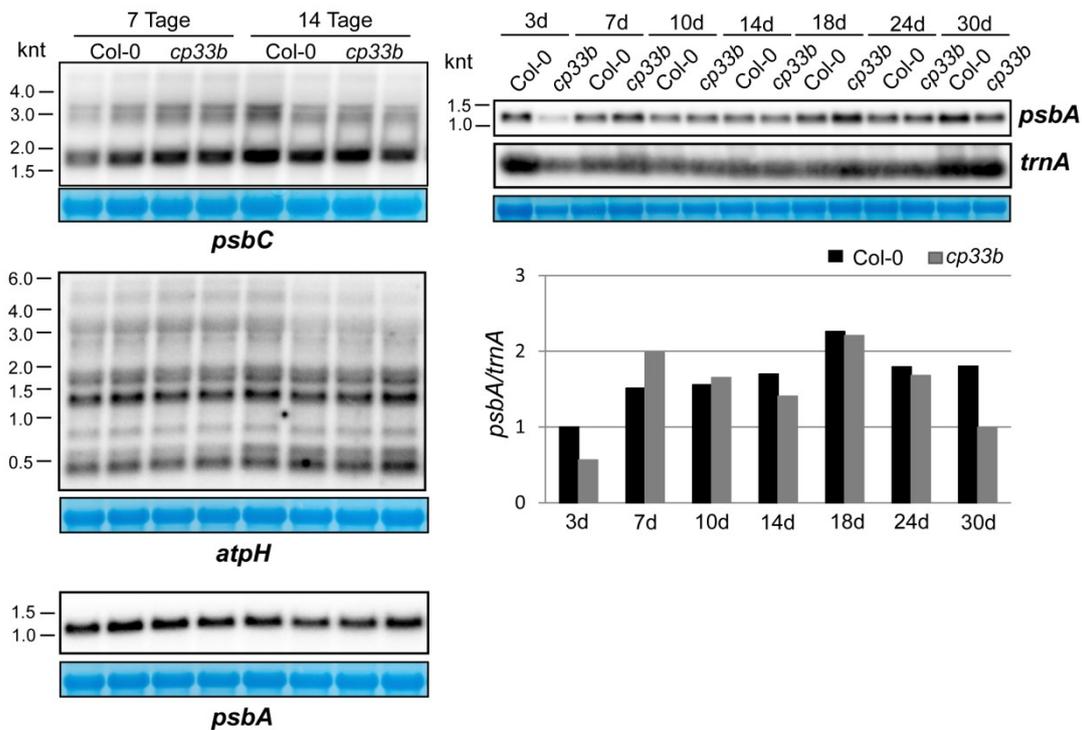


Abb. 20: Northern-Analysen plastidärer Transkripte in *cp33b*-Nullmutanten

Isolierte Gesamt-RNA aus 7 Tage und 14 Tage alten *cp33b*-Mutanten und Wildtyp-Pflanzen wurden auf Nylonmembranen transferiert und mit radioaktiven RNA-Sonden (*psbC*, *atpH* und *psbA*) hybridisiert. Zusätzlich wurde RNA aus Pflanzen mit verschiedenen Altersstufen zwischen 3 bis 30 Tagen in Northern-Analysen mit radioaktiven RNA-Sonden für *psbA* und *trnA* untersucht. Die Detektion von *trnA* dient zur Normalisierung der *psbA*-Signale. Die normalisierten Daten wurden in einem Diagramm aufgetragen (s. unterhalb des Northern-Blots). Es ist jeweils ein Ausschnitt der 25s rRNA dargestellt, welche mit Methylenblau gefärbt wurde und als Kontrolle der gleichmäßigen Beladung diente.

Um zu überprüfen, ob in drei Tage alten *cp33b*-Pflanzen womöglich eine globale Reduktion chloroplastidärer Transkripte vorliegt und zur Verifizierung der Northern-Daten, wurde das gesamte Transkriptom mittels qRT-PCR Reaktionen analysiert. Die relativen Transkriptmengen von je drei biologischen Replikaten wurden mittels der *Actin*-mRNA normalisiert und gemittelt. In einem Diagramm sind die Log₂-Verhältnisse der Transkriptmengen der *cp33b*-Mutante zum Wildtyp aufgetragen (Abb. 21). In den meisten Fällen weisen die Transkriptmengen der *cp33b*-Mutante keine großen Veränderungen relativ zum Wildtyp auf. Ein Log₂ Ratio von 0,5 entspricht einer 1,5 fachen Veränderung der Transkriptmengen. Von insgesamt 74 untersuchten RNAs, liegen 61 Transkripte zwischen Log₂ -0,5 und 0,5. Die restlichen 13 Transkripte weisen Log₂ Anreicherungen zwischen 0,5 und 1 auf. Damit gibt es keine RNA in *cp33b*-Mutanten, deren Menge sich um das 2-fache gegenüber dem Wildtyp verändert. Am stärksten reduziert sind die *psbA* und *psbB* mRNA; interessanterweise handelt es sich hierbei um die D1- und D2-Proteine, welche das Reaktionszentrum des Photosystem II bilden. Die stärksten Anreicherungen weisen mRNAs

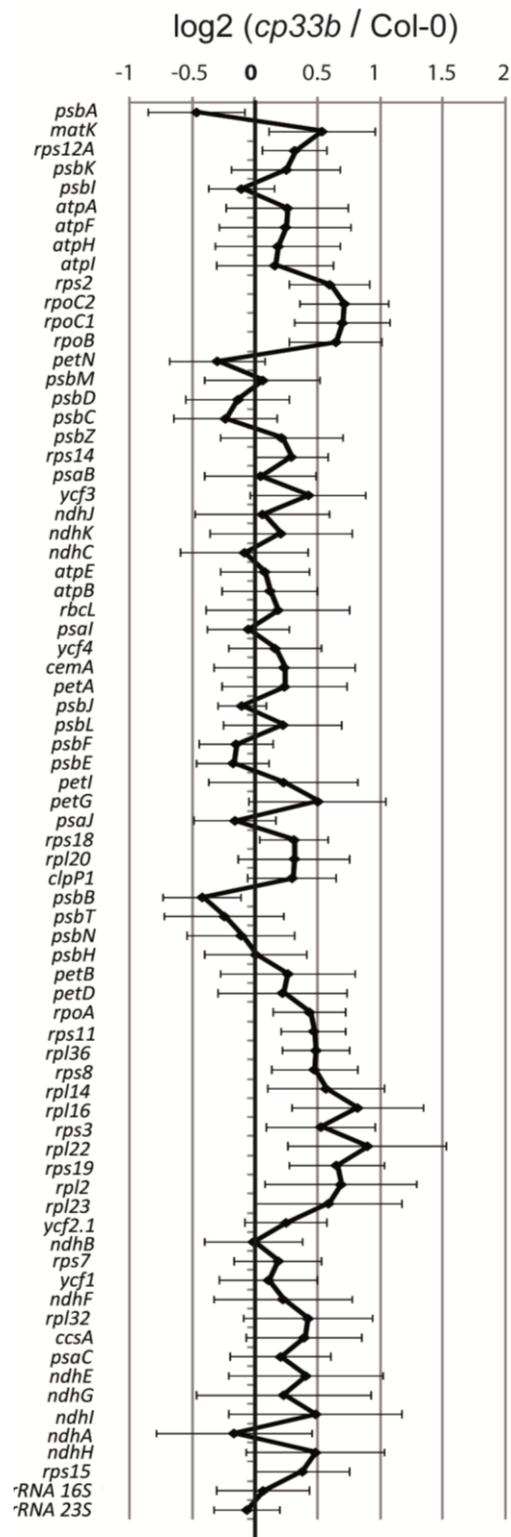


Abb. 21: Transkriptmengen in drei Tage alten *cp33b*-Mutanten sind größtenteils unverändert

Quantitative Real-Time (qRT) PCR wurde durchgeführt um Transkriptmengen plastidärer RNAs auf Transkriptom-Ebene in drei Tage alten Wildtyp und *cp33b*-Nullmutanten zu vergleichen. Es wurden jeweils drei biologische Replikate untersucht. Die Messung der *Actin*-mRNA diente zur Normalisierung der relativen RNA-Konzentrationen, welche anschließend gemittelt und als Log2 Quotient gegen den Wildtyp in einem Diagramm aufgetragen wurden (Daten in Tabelle 11, Anhang). Als Signifikanztest wurde ein ungepaarter Zweistichproben-t-Test (zweiseitig) gewählt. Keine der untersuchten Transkripte wies ein Wert $P \leq 0,01$ auf.

der PEP (*rpoC2*, *rpoC1*, *rpoB* und *rpoA*), sowie mRNAs für ribosomale Proteine (*rpl22*, *rpl16*, *rpl2*, *rps19*, *rps2*, *rpl23* und *rpl14*) und *matK* auf. Jedoch sind die Veränderungen in der RNA-Akkumulation aller untersuchten Transkripte nicht signifikant. So ergibt ein ungepaarten Zweistichproben-t-Test (zweiseitig) für keines der Transkripte $P \leq 0,01$ (s. Tabelle 11). Dieses Ergebnis schließt tatsächliche Veränderungen der Transkriptmengen für *psbA* und weiterer mRNAs in den *cp33b*-Mutanten noch nicht aus. Geringe Unterschiede zwischen zwei Genotypen lassen sich bei einer geringen Stichprobenanzahl (wie z.B. drei Replikate in dieser Studie) schwer als signifikant identifizieren.

Die qRT-PCR Daten können zumindest eine Tendenz in der Reduktion von *psbA* in jungen *cp33b*-Mutanten, wie in den Northern-Daten beobachtet, bestätigen. Insgesamt führt der Verlust von CP33B in drei Tage alten Pflanzen zu keinen großen Veränderungen der Transkriptmengen gegenüber dem Wildtyp.

3.6.5 CP33B ist kein essentieller Spleiß- oder Edierungsfaktor

Einige Vertreter der cpRNPs aus Arabidopsis sind am Spleißen und der Edierung plastidärer Transkripte beteiligt (Tillich et al. 2009, Kupsch et al. 2012). Im Folgenden wurde ein Einfluss von CP33B aufs Spleißen und auf die C→U mRNA Edierung untersucht. Ungespleißte und gespleißte Transkripte aus cDNA-Präparationen von drei Tage alten Wildtyp und *cp33b*-Keimlingen wurden in einer qRT-PCR analysiert. Die Durchführung und Auswertung der qRT-PCR erfolgte wie für *cp33a*-Mutanten (s. Kapitel 3.4.3.1). Der Quotient aus gespleißter zu ungespleißter mRNA zeigt nur sehr geringe Unterschiede (Abb. 22). Damit ist die Spleißeffizienz in den *cp33b*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp kaum verändert. Bei separater Betrachtung der gespleißten und ungespleißten qRT-PCR Daten ergibt sich ein ähnliches Bild. Von insgesamt 12 untersuchten Introns zeigen 11 gespleißte (Anhang Abb. 10A) und 10 ungespleißte Transkripte (Anhang Abb. 10B) eine relative Anreicherung zwischen 0 und 0,5. Nur die gespleißte *rpl2* und die ungespleißten *rpl16* und *rpl2* mRNAs weisen höhere Log₂-Ratios auf, die jedoch einen Wert von 0,8 nicht überschreiten. Damit akkumulieren in Übereinstimmung mit den qRT-PCR Daten des Chloroplasten Transkriptom (Abb. 21) mRNAs für ribosomaler Proteine, gespleißte als auch ungespleißte, in den *cp33b*-Mutanten am stärksten. Eine Signifikanzanalyse mittels ungepaarten Zweistichproben-t-Test (zweiseitig) ergibt jedoch weder für mRNAs ribosomaler Proteine noch für andere Transkripte einen Wahrscheinlichkeitswert $P \leq 0,01$ (s. Tabelle 12). Damit ist der gemessene Unterschied der Transkriptmengen für gespleißte und ungespleißte mRNAs nicht signifikant. Insgesamt ist CP33B kein essentieller Faktor für das Spleißen in drei Tage alten Arabidopsis-Pflanzen.

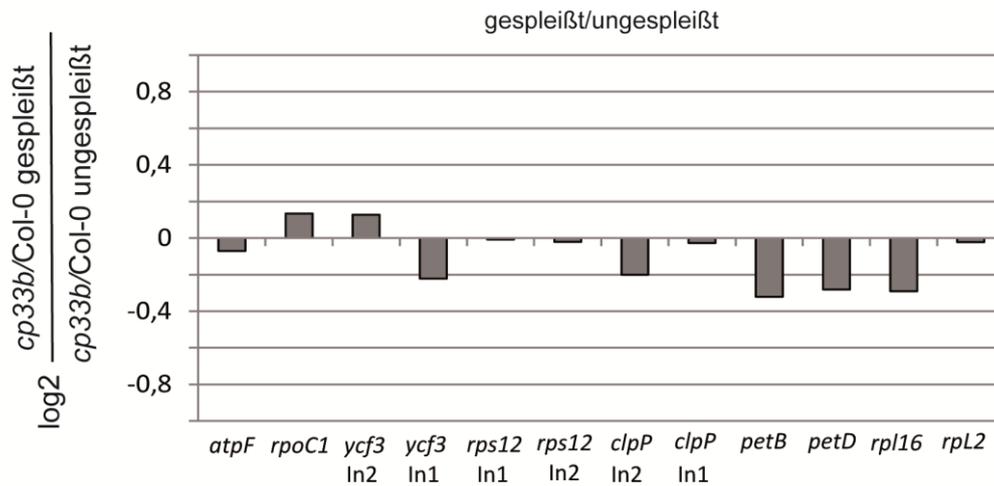


Abb. 22: Keine Spleißdefekte in *cp33b*-Nullmutanten

Quantitative Real-time (qRT)-PCR wurde genutzt um die Transkriptmengen von gespleißten und ungespleißten mRNAs in 3 Tage alten Wildtyp-Pflanzen und *cp33b*-Mutanten zu ermitteln. Es wurden jeweils drei biologische Replikate untersucht. Die Messung der *Actin*-mRNA diente zur Normalisierung der relativen RNA-Konzentrationen. Log2 Quotienten wurden errechnet aus *cp33b*/Col-0 gespleißter zu *cp33b*/Col-0 ungespleißter mRNA (komplette Daten s. Tabelle 12, Anhang). Abkürzung: In1, In2 = Intron1, Intron2.

Zusätzlich zum Spleißen wurde auch der Edierungsstatus der C→U Edierungsstellen einiger plastidärer Transkripte in *cp33b*-Mutanten analysiert. Insgesamt wurden 12 Edierungsstellen durch Sequenzierung cDNA-basierter PCR-Produkte (Primersequenzen in Tabelle 3, Anhang) von 14 Tage alten Wildtyp und *cp33b*-Mutanten geprüft. Bei den untersuchten mRNAs, handelte es sich um Transkripte die laut RIP-Chip-Analysen mit CP33B interagieren (s. Kapitel 3.2.3). Es konnte kein Unterschied in den Edierungseffizienzen von *cp33b*-Mutanten und Wildtyp-Pflanzen identifiziert werden (Abb. 23). Damit hat CP33B keinen essentiellen Einfluss auf die Edierung seiner Ziel-RNAs.

Edierungsstelle	<i>clpP-1</i>	<i>matK</i>	<i>atpF</i>	<i>ndhF</i>	<i>psbZ</i>	<i>accD-1</i>	<i>accD-2</i>	<i>rps14-1</i>	<i>rps14-2</i>	<i>ndhD-3</i>	<i>ndhD-4</i>	<i>ndhD-5</i>
Genomposition	69942	2931	12707	112349	35800	57868	58642	37161	37092	116494	116290	116281
DNA												
Col-0												
<i>cp33b</i>												
	A T T	A T T	A T C	A A T	A A T	A A C	A A T	A T T	A T C	A T T	A T T	C T C

Abb. 23: Keine Edierungsdefekte in *cp33b*-Mutanten

Zwölf ausgewählte C→U-Edierungsstellen wurden in 14 Tage alten *cp33b* und Wildtyp-Pflanzen (Col-0) durch Sequenzierung cDNA-basierter PCR-Produkte untersucht (Primersequenzen s. Tabelle 3). Teilweise wurde als Kontrolle Wildtyp-DNA sequenziert. Von den drei dargestellten Basen, ist die mittlere Base die Edierungsstelle. Die Analysen wurden mit einem weiteren biologischen Replikat durchgeführt mit gleichem Ergebnis.

3.6.6 CP33B hat keinen essentiellen Einfluss auf die Translationseffizienz von *psbA*

Durch Polysomenanalysen wurde gezeigt, dass CP33B nicht mit Polysomen assoziiert und somit kein Bestandteil des Translationsapparates darstellt (s. Kapitel 3.3). Dennoch ist ein Einfluss von CP33B auf die Translationseffizienz bestimmter Transkripte möglich. CP33B interagiert mit 90% des im Stroma befindlichen *psbA* Anteils (Abb. 8). Die Translation von *psbA* findet jedoch an membrangebundenen Polysomen statt (Klein et al 1988). Da CP33B auch in den Membranen identifiziert wird und dort mit *psbA* interagiert (Abb. 25), ist dessen Einfluss auf die Translation von *psbA* gut vorstellbar. Um dies zu überprüfen, wurden intakte Polysomen aus Wildtyp und *cp33b*-Mutanten präpariert und auf einem Saccharosegradienten größenfraktioniert. Es folgte eine RNA-Isolation aus den einzelnen Fraktionen mit anschließender Northern-Analyse, mit radioaktiven Sonden für *psbA* und *atpB*. Im Gegensatz zu *psbA* ist *atpB*, laut den Stroma RIP-Chips (Abb. 8) keine Ziel-RNA von CP33B und dient somit als Negativ-Kontrolle. Die Verteilung der ribosomalen RNAs innerhalb des Dichtegradienten wird durch die Methylenblaufärbung sichtbar (Abb. 24) und entspricht dem erwarteten Muster (Barkan 1993). Damit war die Auftrennung der Ribosomen in Monosomen (Fraktionen 1-4) und Polysomen (Fraktionen 5-12) erfolgreich. Zudem unterscheiden sich Mutante und Wildtyp nicht in ihrem rRNA Transkriptmuster, damit führt der Verlust von CP33B zu keiner veränderten Verteilung der Ribosomen.

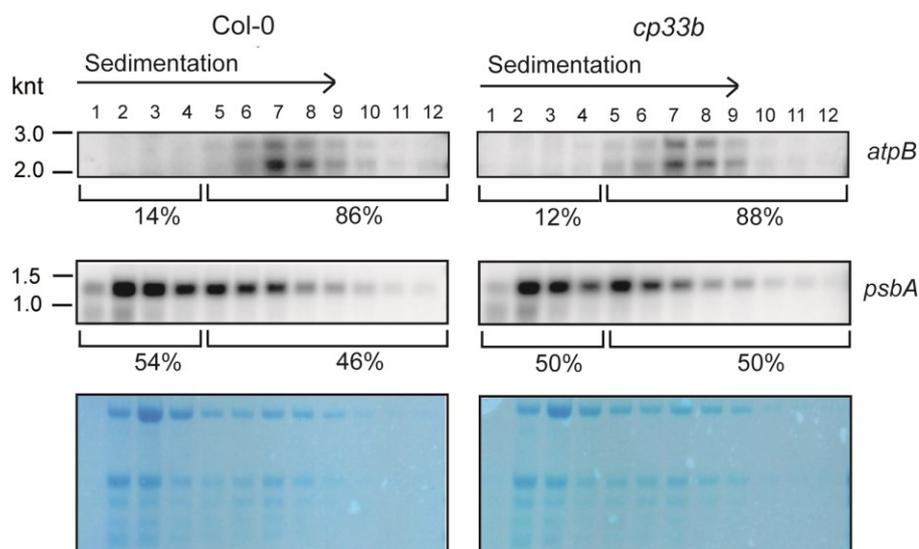


Abb. 24: Die Translationseffizienz von *psbA* ist in *cp33b*-Mutanten unverändert

Intakte Polysomen aus 14 Tage alten Wildtyp und *cp33b*-Blattlysaten wurden auf einem Saccharosegradienten (15%-55%) größenfraktioniert. Die aus den einzelnen Fraktionen isolierte RNA wurde auf Nylonmembranen transferiert und mit radioaktiv markierten Sonden für *psbA* (Oligonukleotid-Sonde, *psbA* (10a)) und *atpB* (RNA-Sonde) hybridisiert. Nach der Quantifizierung der Signale mit Hilfe der Quantity-One Software (Bio-Rad), wurde jeweils der prozentuale Anteil der Transkriptmengen in den Fraktionen 1-4 und 5-12 berechnet. Die Verteilung der rRNAs (Methylenblaufärbung) weist auf intakte Polysomen hin. So befinden sich Monosomen in den ersten vier Fraktionen und in den dichteren Fraktionen Polysomen (Roy und Barkan 1998). Die Analyse wurde für *psbA* ein weiteres Mal mit ähnlichem Ergebnis wiederholt.

Der Hauptteil des *psbA* Transkriptes wird erwartungsgemäß in den leichteren Monosomen-Fractionen detektiert und nimmt mit Zunahme der Dichte des Gradienten ab (Kim und Mullet 1994, Hotto et al. 2010). Das *atpB* Transkript lokalisiert dagegen vor allen in den höheren Polysomen-Fractionen, was eine aktive Translation dieser mRNA darstellt. Die einzelnen RNA-Signale konnten mittels der Quantity-One Software (Bio-Rad) quantifiziert und der prozentuale Anteil der Transkriptmengen der Fractionen 1-4 und 5-12 berechnet werden. Insgesamt ist das Verteilungsmuster von *psbA* und *atpB* in Wildtyp und *cp33b* Mutanten sehr ähnlich. Dieses Ergebnis wurde durch weitere Polysomenanalysen, innerhalb der Masterarbeit von Johannes Schulze, bestätigt. Ein in dessen Arbeit durchgeführter Signifikanztest (ungepaarter Zweistichproben-t-Test) lieferte keinen signifikanten Unterschied in der Translationseffizienz von *psbA* zwischen *cp33b*-Mutante und Wildtyp (s. Masterarbeit J. Schulze). Damit ist CP33B unter Standardwachstumsbedingungen kein essentieller Faktor für die Translationseffizienz von *psbA*.

3.6.7 CP33B ist nicht essentiell für die Lokalisation der *psbA* mRNA

Die Proteinsynthese von D1 erfolgt an membrangebundenen Polysomen (Klein et al. 1988). Da der Hauptanteil von *psbA* jedoch im Stroma vorliegt, ist eine Lokalisierung von *psbA* zu den Membranen erforderlich. Fluoreszenzmikroskopie-Bilder und biochemische Analysen bestätigen für CP33B eine Lokalisation in beiden Kompartimenten (Abb. 4 und Abb. 5). Womöglich ist CP33B an der Lokalisierung von *psbA*, zwischen Stroma und Membranen beteiligt. So spielen hnRNPs, von denen einige Vertreter (z.B. hnRNP A1 und hnRNP A2) phylogenetisch mit den cpRNPs verwandt sind (Maruyama et al. 1999), eine Rolle im Transport von mRNAs (Dreyfuss et al. 2002), u.a. ist hnRNP A1 beim RNA-Export aus dem Zellkern beteiligt (Jean-Philippe et al. 2013).

Die bisherigen RIP-Chip Experimente (s. Kapitel 3.2.3) wurden stets mit Stroma-Material durchgeführt. Um zu testen ob CP33B auch mit RNAs in den Membran-Fractionen interagiert, wurden aufgeschlossene Chloroplasten in Stroma und Membranfractionen getrennt, die Membranen fünfmal gewaschen und schließlich nach der Solubilisierung für eine Immunopräzipitation von CP33B verwendet (Anhang Abb. 11). Anschließend wurden die isolierten RNAs aus Präzipitat und Überstands-Fraktion isoliert und auf dem Gesamt-Chloroplastengenom *Microarray* hybridisiert. Die Daten-Auswertung erfolgte analog der des Stroma RIP-Chip (s. Kapitel 3.2.3).

Ergebnisse

Insgesamt ist die RNA-Anreicherung im Membran RIP-Chip geringer als im Stroma RIP-Chip (vergleiche Abb. 25A mit Abb. 8). So ist der Abstand der Anreicherungswerte der CP33B-Immunopräzipitation aus Wildtyp-Membranen gegenüber den Kontroll-Werten sehr gering. Dies macht es schwierig, zwischen stärker und schwächer assoziierten RNAs zu unterscheiden. Aus diesem Grund wurde zusätzlich eine Darstellung der Daten als doppelter Ratio angefertigt. In dieser ist das Präzipitat/Überstand-Verhältnis des Wildtyps als Quotient zum Präzipitat/Überstand-Verhältnis der *cp33b*-Mutante aufgetragen (Abb. 25B).

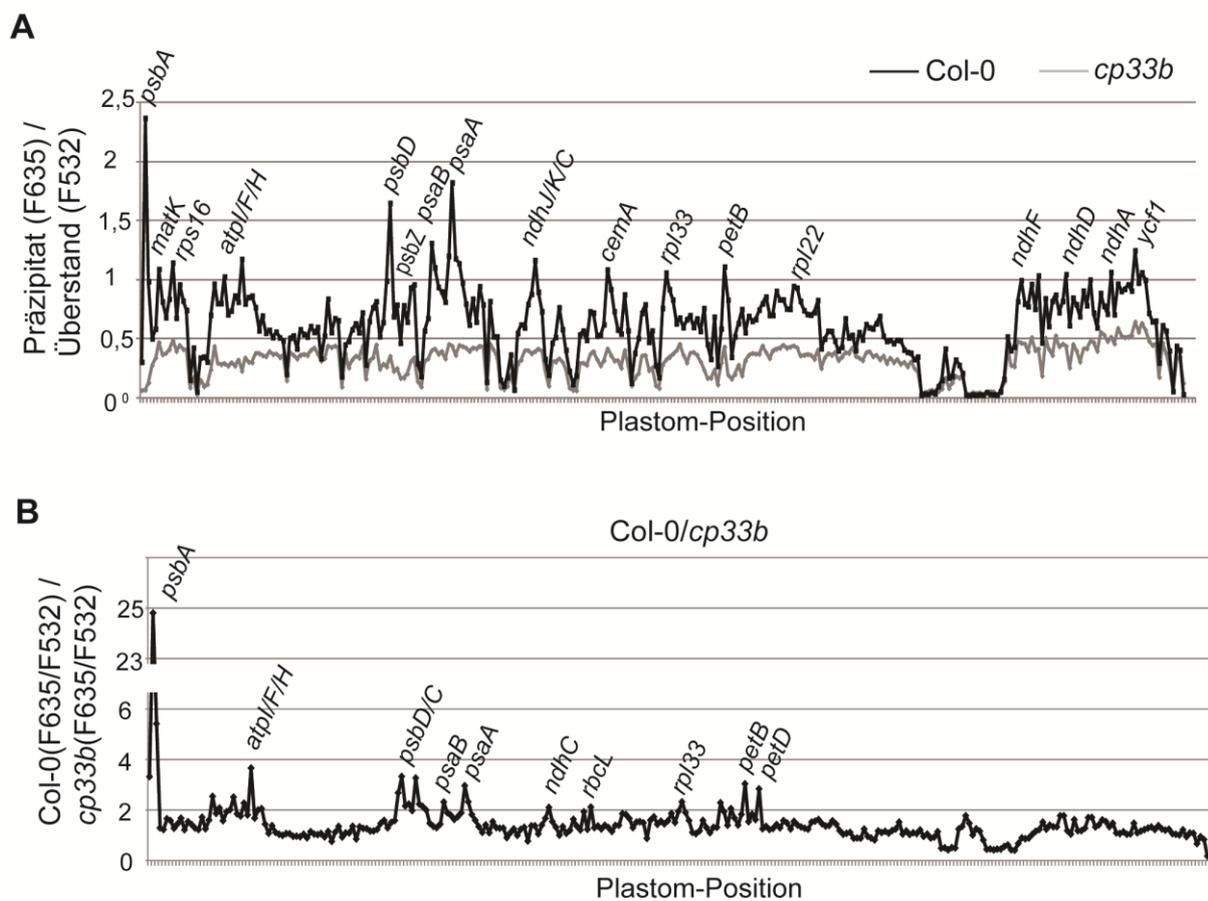


Abb. 25: CP33B interagiert mit multiplen RNAs in den Thylakoiden

Chloroplasten aus Wildtyp Pflanzen und *cp33b*-Nullmutanten wurden in Stroma und Membranen fraktioniert. Die Membranen wurden gewaschen und anschließend für Immunopräzipitationen mit dem anti-CP33B Antikörper verwendet. Nach der Hybridisierung der kopräzipitierten und ungebundenen RNA auf einem *Microarray* erfolgte die Auswertung mit Hilfe der GenePix 6.0 Software (Molecular Devices). Die Präzipitat/Überstand Verhältnisse (Median (*Median of Ratios*)) wurden auf die Summe der Medianwerte der ribosomalen RNAs der Überstände (Median F532) normalisiert (Daten in Tabelle 7, Anhang). (A) Verhältnisse der Fluoreszenzsignale aus kopräzipitierter RNA (F635) und ungebundener RNA (F532) von Wildtyp und *cp33b*-Mutante aufgetragen gegen die Position auf dem Chloroplastengenom. (B) Quotient aus Präzipitat/Überstand des Wildtyps und Präzipitat/Überstand der *cp33b* Mutante aus (A). Die *psbA* mRNA akkumulierte so stark, dass für die Darstellung der anderen Ziel-RNAs die y-Achse unterbrochen wurde. Gekennzeichnet in den Diagrammen sind Transkripte mit den höchsten Anreicherungswerten

Auch in der Membran assoziiert CP33B mit einem Großteil der plastidären Transkripte. Am stärksten kopräzipitiert im Wildtyp *psbA* mit CP33B, aber auch die mRNAs von *psbD/C*, *psaB/psaA*, *ndhJ/K/C*, *petB* und *atpF/H* akkumulieren stark im Präzipitat. Die 20 stärksten angereicherten Transkripte des Stroma RIP-Chips finden sich auch unter den stärksten angereicherten mRNAs im Membran-RIP-Chip wieder. Umgekehrt akkumuliert die *rpl33* mRNA stark in den Membran-IPs, jedoch nur schwach in den Stroma-IPs. CP33B interagiert damit sowohl in den Thylakoiden als auch im Stroma mit multiplen und weitgehend identischen chloroplastidären RNAs.

Um zu überprüfen, ob CP33B einen Einfluss auf die Verteilung seiner Ziel-RNAs zwischen Stroma und Thylakoiden hat, wurde die Lokalisation des *psbA* Transkriptes zwischen den beiden Kompartimenten in Wildtyp und *cp33b*-Mutanten untersucht. Chloroplasten wurden hierfür über eine „*quick and dirty*“ Methode, ohne Percollgradient, angereichert und in lösliche (Stroma) und unlösliche (Membranen) Fraktionen aufgetrennt. Aus gleichen Anteilen der Fraktionen wurde RNA extrahiert. Bei den anschließend durchgeführten Northern-Analysen dienten radioaktive Sonden für die 23S rRNA als Ladungskontrolle. Das Verhältnis von Membran zu Stroma der relativen *psbA* Transkriptmengen ist in einem Diagramm dargestellt (Abb. 26). Demnach gibt es keinen Unterschied in der *psbA* Verteilung zwischen Wildtyp und *cp33b*-Mutante in Chloroplasten belichteter Pflanzen (Abb. 26A).

Zusätzlich wurde die *psbA* Lokalisation in 14 Tage alten Dunkelmaterial untersucht, welches eine um 0,5 – 1h verlängerte Nachtphase erlebte. Dabei erfolgte die Chloroplastenisolation im Dunkeln und über einen Percollgradienten. Nach der Quantifizierung und Normalisierung der Signale mittels der 23S rRNA wurden die Membran/Stroma Verhältnisse berechnet und dargestellt (Abb. 26B). Es ergibt sich kein großer Unterschied in der *psbA*-Verteilung zwischen beiden Genotypen. So liegt der Quotient aus *psbA*-Membran/*psbA*-Stroma im Wildtyp bei 2,8 und in der *cp33b* Mutante bei 2,4 (Abb. 26B). Damit ist marginal mehr *psbA* Transkript in den Membranen des Wildtyps lokalisiert im Vergleich zur Mutante. Auch hier wären weitere biologische Replikate nötig um solch einen kleinen Unterschied als signifikant zu bestätigen.

Insgesamt liegen keine eindeutigen Veränderungen in der Verteilung der *psbA* mRNA zwischen Stroma und Membranen in den *cp33b*-Mutanten vor, damit ist CP33B kein essentieller Faktor für die Lokalisierung des *psbA* Transkriptes an die Thylakoid- oder Hüllmembranen.

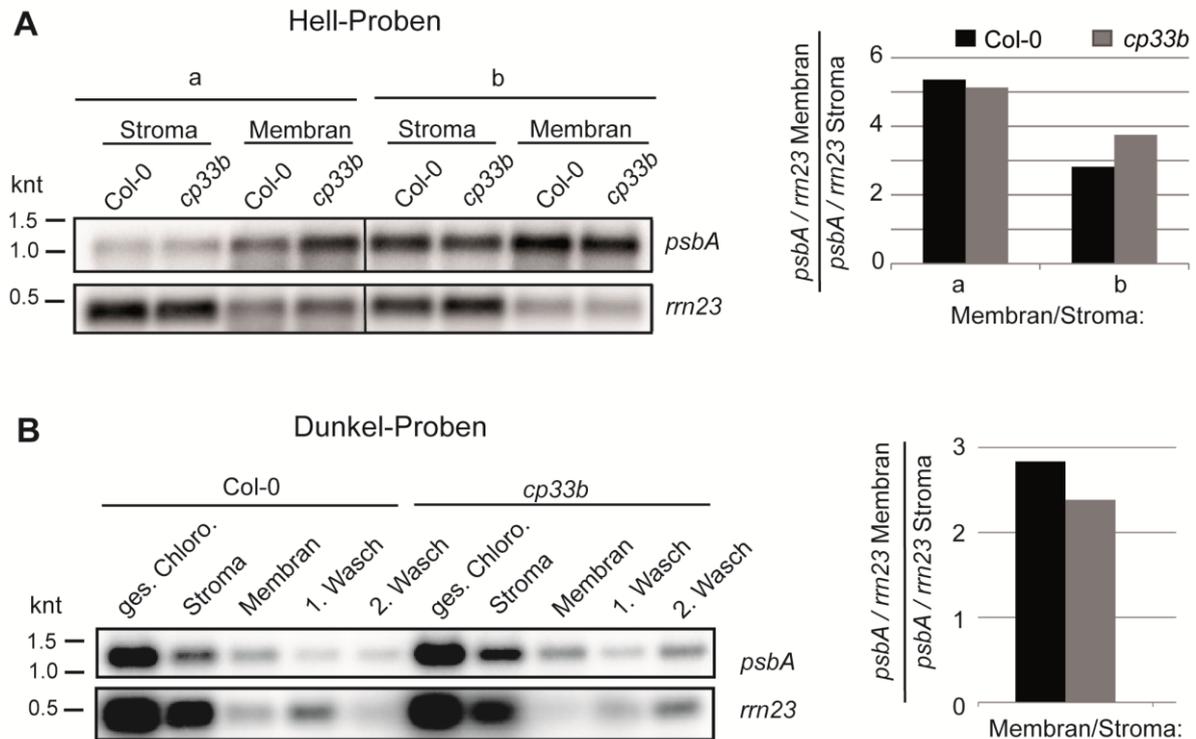


Abb. 26: Die Verteilung der *psbA* mRNA ist in den Chloroplasten der *cp33b*-Mutanten nicht verändert

(A) Im Anschluss der Nachtphase wurden Wildty- Pflanzen und *cp33b*-Nullmutanten für ca. 0,5- 1h belichtet. Die Chloroplasten-Isolation erfolgte ohne einen Percollgradienten aus je zwei biologischen Replikaten (a und b). Je nach Replikat wurden zwei verschiedene Puffer für den Aufschluss der Chloroplasten und später unterschiedliche Mengen für die RNA-Isolation verwendet. Chloroplasten wurden in Stroma und Membranen fraktioniert und RNA aus gleichen Anteilen isoliert. Die auf Nylonmembran transferierten RNAs wurden mit radioaktiven Sonden für *psbA* und zur Normalisierung mit *rm23* hybridisiert. Die RNA-Signale wurden mittels der Image Lab Software (Bio-Rad) quantifiziert und das Membran/Stroma Verhältnis aus den Quotienten *psbA/rm23* berechnet und dargestellt. (B) Chloroplastenisolation erfolgte mittels eines Percollgradienten aus Pflanzen mit einer um 1-2 Stunden verlängerten Nachtphase. Neben der RNA-Isolation aus zuvor fraktionierten Stroma und Membranen, wurden zusätzlich intakte Chloroplasten (ges. Chloro.) sowie die 1. und 2. Waschfraktion der Membranen untersucht. Das Membran/Stroma Verhältnis wurde wie in (A) beschrieben berechnet und dargestellt.

3.7 RNA-Bindestudien mit CP33B

3.7.1 CP33B interagiert mit *psbA* an multiplen Bindestellen

In Kupsch (et al. 2012) wurde belegt, dass CP31A vor allem mit der 3'UTR von *ndhF* interagiert und damit zur Stabilisierung des *ndhF*-3'Endes beiträgt. Somit kann die Entschlüsselung der Bindestelle eines RNA-Bindeproteins Hinweise über dessen Funktion geben. Zur besseren Auflösung der CP33B-Bindestelle wurde eine RIP-Chip-Analyse wie in Kapitel 3.2.3 durchgeführt, wobei die RNA-Hybridisierung diesmal auf einem Oligonukleotid-Microarray erfolgte, anstatt auf einem Array bestehend aus 500-1000 bp langen PCR-Produkten. Der Oligonukleotid-Microarray umfasst 50nt lange Oligonukleotide

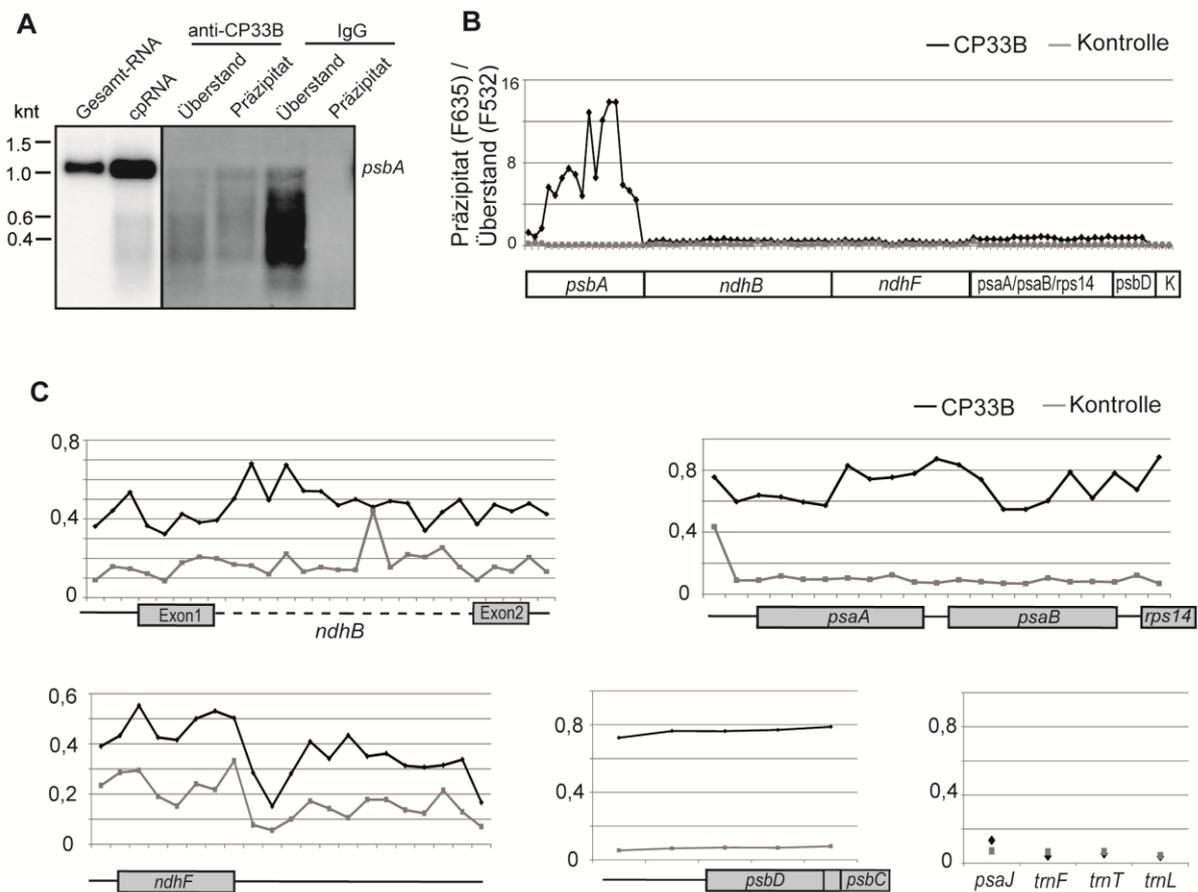


Abb. 27: Oligonukleotid-RIP-Chip-Analyse zur Einengung der CP33B Bindestellen

(A) RNA aus Präzipitat und Überstand-Fractionen einer CP33B Immunpräzipitation wurde neben RNA aus Pflanzenextrakten (Gesamt-RNA) und Chloroplasten-RNA (cpRNA) auf eine Nylonmembran transferiert und mit einer radioaktiven Sonde für *psbA* hybridisiert. (B und C) Oligonukleotid-RIP-Chip-Analyse für die Interaktion von CP33B mit einer Auswahl an chloroplastidären Transkripten. CP33B-Immunpräzipitationen erfolgten aus Wildtyp Stroma mit anti-CP33B (4 biologische Replikate) und als Kontrolle mit dem entsprechenden Präimmunsereum (3 biologische Replikate). Dargestellt sind die Quotienten (Median (*Median of Ratios*)) der Fluoreszenzsignale aus kopräzipitierter RNA (F635) und ungebundener RNA (F532). Diese Verhältnisse wurden zuvor auf die Summe der Medianwerte der Überstände (Median F532) aller Transkripte, außer für *psbA*, normalisiert (Sequenzen der Oligonukleotide und Daten in Tabelle 9, Anhang). (B) Übersicht des gesamten Oligonukleotid-Microarrays. Die Auswahl der plastidären Transkripte, mit Ausnahme der Kontrollen (K) werden jeweils durch mehrere Oligonukleotide (50 nt lang) repräsentiert. (C) Vergrößerte Darstellung der RIP-Chip Ergebnisse aus (B) einzelner Transkripte, außer für *psbA* (dafür siehe Abb. 28). Graue Balken repräsentieren kodierende Bereiche, schwarze Striche nicht-kodierenden Bereiche und die gestrichelte Linie das *ndhB* Intron. Als Kontroll-Oligonukleotide wurden Sequenzen für *psaJ*, *trnF*, *trnT* und *trnL* verwendet (untere Abbildung rechts).

mit Sequenzen von einer Auswahl an chloroplastidären Transkripten. Bei den Transkripten handelt es sich um Ziel-RNAs von CP33B. So befinden sich neben Oligonukleotiden für *psbA*, auch Oligonukleotide für *ndhB*, *ndhF*, *psaD* und das *psaA-psaB-rps14* Operon auf dem *Microarray*. Als Kontrollen dienten Sonden für RNAs die im Gesamtchloroplasten-*Microarray* keine Interaktion mit CP33B zeigten: *psaJ*, *trnF*, *trnT* und *trnL*.

Für die CP33B-Immunpräzipitation wurde Wildtyp Stroma verwendet und als Kontrolle diente die Immunpräzipitation mit dem Prä-Immunsereum des CP33B-Antikörpers. Während

der Stromaextraktion und der Immunopräzipitation wirken plastidäre RNasen, welche entscheidend sind für die Einengung der Bindestelle und den Erfolg dieses Experimentes. So werden von CP33B gebundene RNA-Regionen geschützt und infolgedessen weniger abgebaut und im Oligonukleotid-RIP-Chip angereichert. Auf ähnliche Weise wurden so bereits die Bindestellen von anderen RNA-Bindeproteinen untersucht (Kupsch et al. 2012, Zoschke et al. 2010). Die gewünschte partielle Degradation der RNA wird durch Northern-Analysen von extrahierter RNA aus Überstand- und Präzipitat-Fractionen einer CP33B-Immunopräzipitation mit einer *psbA* Sonde verdeutlicht. In beiden Fractionen werden *psbA* Fragmente in der Größe von ca. 200 nt bis 1000 nt detektiert. Ebenso ist isolierte RNA aus intakten Chloroplasten leicht degradiert, dagegen zeigt Gesamt-RNA aus Pflanzenmaterial keine Degradation (Abb. 27A).

Die Auswertung der Oligonukleotid-RIP-Chip Daten erfolgte, bis auf die Normalisierung, wie in Kapitel 3.2.3 beschrieben. Zur Normalisierung wurde die Summe der Medianwerte der Überstände (Median F532) aller Transkripte, außer für *psbA*, verwendet. Da der Großteil des *psbA*-Transkriptes mit CP33B interagiert, kommt es zu einer starken Abreicherung der *psbA* mRNAs im Überstand, was im Gegensatz dazu auf die schwächeren Ziel-RNAs von CP33B nicht zutrifft (s. Tabelle 9, Anhang).

Das gesamte *psbA* Transkript ist gegenüber den Kontrollexperimenten mit Präimmunseren und auch im Vergleich zu den restlichen Ziel-Transkripten stark angereichert (Abb. 27B). Im Mittelwert aller Sonden zeigt das *psbA* Transkript eine 12fach stärkere Anreicherung mit CP33B im Vergleich zu allen restlichen untersuchten Transkripten auf dem *Microarray* (ausgenommen der Kontroll-Oligonukleotide). Das *psaA/psaB/rps14* Operon sowie *ndhB*, *ndhF*, und *psaD* sind gegenüber der Kontrolle leicht angereichert (Abb. 27C). Dabei lässt sich keine eindeutige Präferenz der CP33B-Bindung innerhalb dieser mRNAs feststellen. CP33B assoziiert bei allen Transkripten, einschließlich *psbA*, auch mit Bereichen der 5' und 3'UTRs. Die untersuchten Kontrollen (*psaJ*, *trnF*, *trnT* und *trnL*) wiesen alle keine Anreicherung für CP33B auf.

Die starke Interaktion von *psbA* mit CP33B, wird hiermit ein weiteres Mal bestätigt (vergleiche Abb. 8). Daher ist die Identifizierung der Bindestelle/n von CP33B innerhalb der *psbA* mRNA von besonderem Interesse. Der zunächst durchgeführte Oligonukleotid-*Microarray* deckt jedoch nicht das gesamte *psbA* Transkript lückenlos mit Oligonukleotiden ab. Daher wurden weitere Replikate mit einem erweiterten Oligonukleotid-Array durchgeführt, und mit den „alten“ Oligonukleotid-RIP-Chip Daten vereint (siehe Abb. 28). Am stärksten interagiert CP33B mit dem 3'Ende der kodierenden Region von *psbA*.

Mittelstarke Anreicherungen befinden sich jedoch auch am 5' Ende und in der mittleren Region des *psbA*-ORF. Zudem werden erhöhte Anreicherungswerte innerhalb der nicht-translatierten Bereiche der 5'UTR (stromabwärts vom Promotor) und der 3'UTR (kurz nach/stromabwärts der Stammschleife) detektiert. Die Daten deuten insgesamt darauf hin, dass CP33B mit mehreren Regionen innerhalb seiner Zieltranskripte interagiert. Die genaue Identifikation der CP33B-Bindestellen wird durch die Hybridisierung langer Transkripte auf dem *Microarray* erschwert. So werden trotz der Wirkung von intrinsischen RNasen zum Teil lange Fragmente mit CP33B präzipitiert, siehe z.B. das Volllängen-Transkript von *psbA* im Präzipitat mit CP33B (Abb. 27A). Dennoch lässt sich insgesamt für die Interaktion von CP33B mit der *psbA* mRNA eine Bevorzugung des 3' Endes identifizieren.

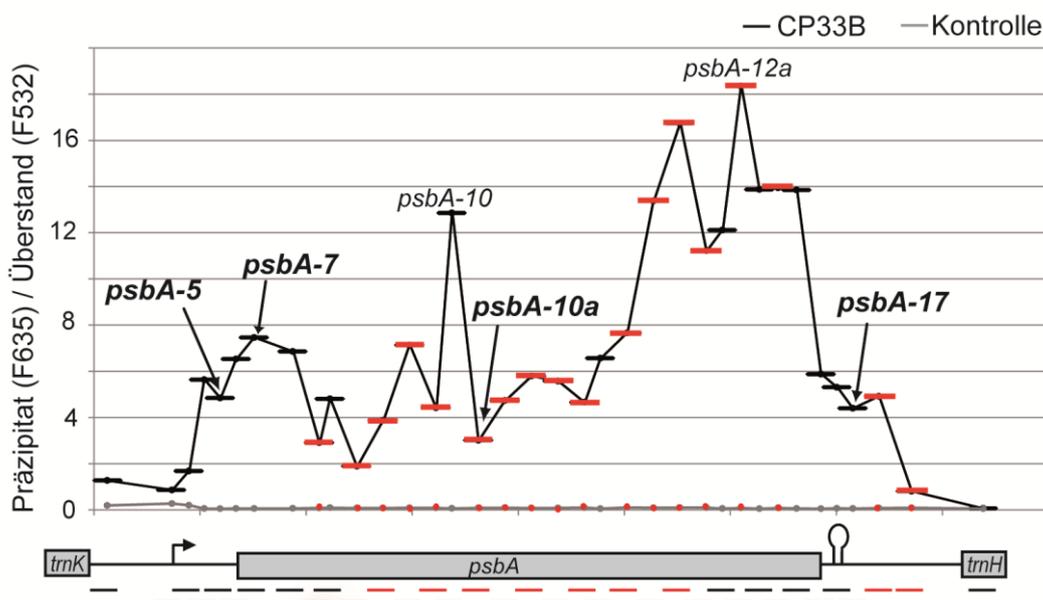


Abb. 28: CP33B interagiert mit *psbA* über multiple Bindestellen mit einer Bevorzugung des 3' Ende

Ausschnitt der Oligonukleotid-RIP-Chip-Analyse für die Interaktion von CP33B mit *psbA*. CP33B-Immunopräzipitationen erfolgten aus Wildtyp Stroma mit anti-CP33B und als Kontrolle mit dem entsprechenden Präimmunsereum. Dargestellt sind die Verhältnisse der Fluoreszenzsignale aus kopräzipitierter RNA (F635) und ungebundener RNA (F532) aus je vier biologischen Replikaten für CP33B-IP und 3 biologischen Replikaten für IPs mit Präimmunsereum als Kontrollen. Da für eine genauere Aufschlüsselung erst später weitere *psbA* Oligonukleotide dem *Microarray* hinzugefügt wurden, wurden einige Anreicherungs-Werte aus nur zwei biologischen Replikaten der CP33B-IP und einem Replikate mit Präimmunsereum gebildet (in Rot dargestellt). Die Medianwerte der Punktreplicate des *Microarrays* wurden auf die Summe der Medianwerte aller RNAs der Überstände, außer die für *psbA*, normalisiert und anschließend gemittelt (Sequenzen der Oligonukleotide und Daten in Tabelle 9, Anhang). Graue Balken repräsentieren die kodierenden Bereiche (*trnK*, *psbA* und *trnH*) und dazwischenliegende schwarze Striche die nicht-kodierenden Bereiche. Eingezeichnet ist der Transkriptionsstart für *psbA* (Pfeil) und eine Stammschleife in der 3'UTR. Die Positionen der verwendeten Oligonukleotide des *Microarrays* werden durch kurze schwarze/rote Striche unterhalb der Genkarte symbolisiert. Einzelne Oligonukleotide, welche für Northern-Analysen (s. Kap. 3.7.2) verwendet wurden, sind im Diagramm fett gedruckt.

3.7.2 *In vitro* Bindestudien mit rekombinanten CP33B

Wie bereits dargestellt, wird die Identifikation der exakten CP33B-Bindestellen innerhalb seiner Ziel-RNAs durch die Kopräzipitation von Vollängen-Transkripten bei einer CP33B-Immunopräzipitation erschwert (s. Kapitel 3.7.1). Durch die Verwendung von fragmentierter RNA in einem *in vitro* CP33B-Bindungstest sollte die Position der RNA-Interaktion/en von CP33B besser aufgelöst werden. Innerhalb des Experiments wurde ein rekombinantes CP33B Protein verwendet (Herstellung innerhalb der Masterarbeit von Tea Kecman). Dabei handelte es sich um ein Tag-freies Protein, ohne Signalpeptid, welches über ein *E.coli* basierendes Expressions- und Aufreinigungs-System (ProfinityXact™ *protein purification system*) generiert wurde. Die fragmentierte RNA wurde durch chemisches Scheren mit Magnesium-Ionen hergestellt und wies eine durchschnittliche Länge von ~ 200 Nukleotiden auf (Abb. 29C). Neben der Verwendung von fragmentierter RNA, wurde die Bindung des rekombinanten CP33B an unfragmentierte RNA untersucht. Dabei wurden zwei verschiedene Arten unfragmentierter RNA als Kontrollen verwendet. Eine RNA-Fraktion blieb nach der Isolierung aus Chloroplasten und anschließender Resuspension in Wasser unverändert. Eine zweite Fraktion unfragmentierter RNA wurde mit demselben Fragmentierungspuffer versetzt, jedoch nicht, wie für eine Fragmentierung nötig, erhitzt. Diese Fraktion unterscheidet sich von der ersten durch eine erhöhte Konzentration an Magnesium-Ionen. Nach der Inkubation des rekombinanten CP33B-Proteins mit den drei verschiedenen RNA-Fraktionen, folgte die CP33B-Koimmunopräzipitation mit anschließender *Dot-Blot*-Analyse der präzipitierten und nicht gebundenen RNAs. Als Kontrolle diente die RNA Inkubation mit MBP (*Maltose binding protein*), einem rekombinanten Protein, welches keine RNA bindet. Die *Dot-Blot*-Membranen wurden mit zwei radioaktiv markierten Oligonukleotiden für *psbA* (*psbA*-10a und *psbA*-7), und *trnA* hybridisiert. Die Hybridisierung gegen *trnA* dient als Negativ-Kontrolle, da es keine Anreicherung im Stroma-RIP-Chip zeigt (s. Abb. 8).

Die Lage der radioaktiv markierten *psbA*-Sonden ist in Abb. 28 dargestellt. Demnach überlappt die Sequenz für das Oligonukleotid *psbA*-7 mit dem Startcodon des ORFs von *psbA*. Das Oligonukleotid *psbA*-10a bindet im mittleren Bereich des *psbA* Transkriptes, direkt nach einer starken Anreicherung im Oligo-RIP-Chip (Oligonukleotid *psbA*-10).

Nach der Quantifizierung der *Dot-Blot*-Signale wurde der Quotient aus Präzipitat und Überstand berechnet und in einem Diagramm aufgetragen (Abb. 29B). Interessanterweise ergibt sich für beide *psbA*-Sonden eine starke Anreicherung mit unfragmentierter RNA als mit fragmentierter RNA (Abb. 29). Da die beiden *psbA*-Sonden unterschiedlich positioniert sind,

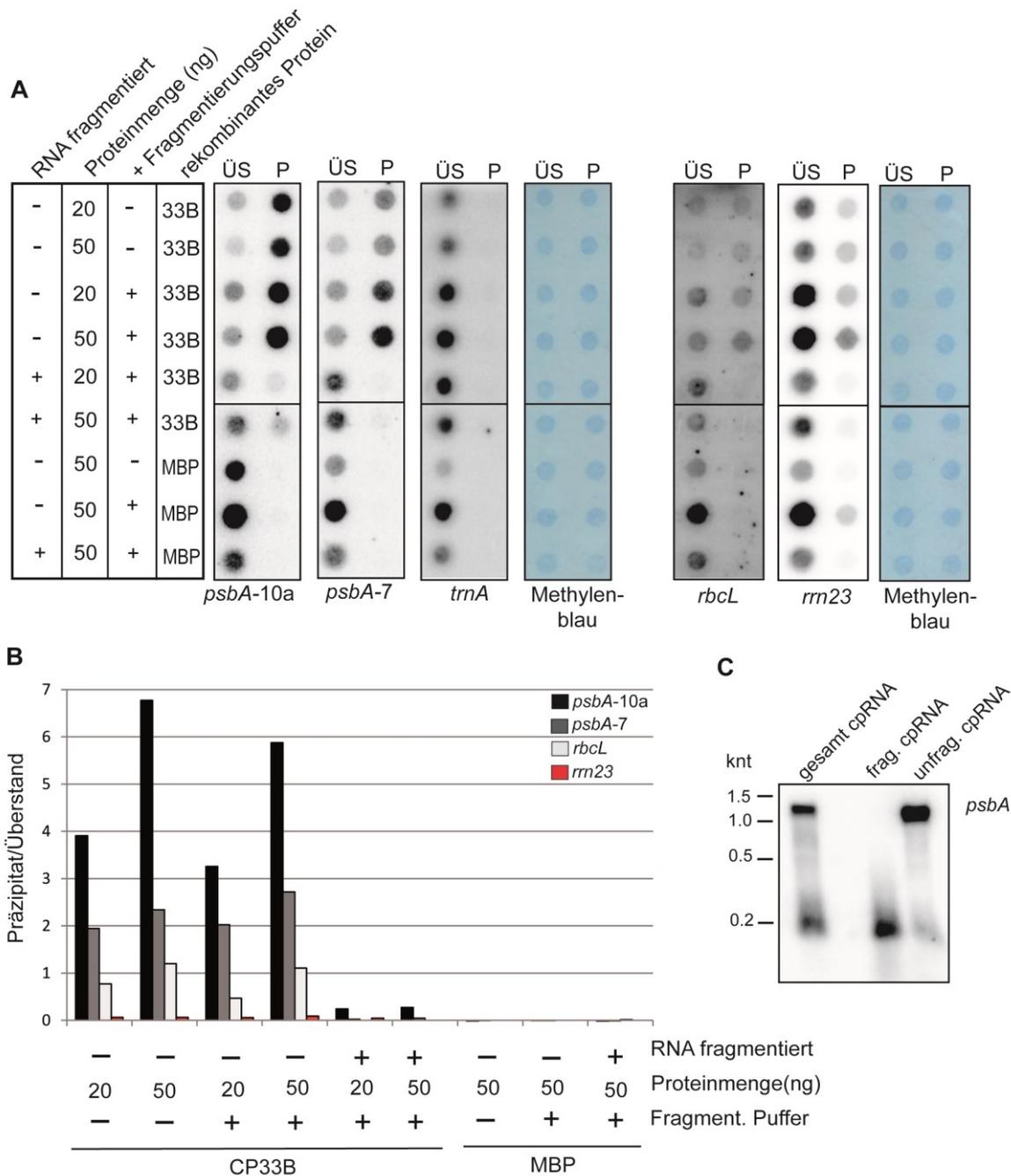


Abb. 29: In vitro Bindestudien mit rekombinatem CP33B

(A) Fragmentierte und unfragmentierte Chloroplasten-RNA wurde mit rekombinanten CP33B (20 oder 50 ng) und als Kontrolle mit 50ng rekombinanten MBP (*Maltose-binding protein*) inkubiert. Es gab zwei Arten unfragmentierter RNA, eine wurde mit Fragmentierungspuffer versetzt, die andere nicht. Nach der CP33B-Immunpräzipitation und anschließender RNA-Isolation, wurden die RNAs auf Nylonmembranen transferiert und mit radioaktiv markierten Oligonukleotid bzw. PCR-Sonden hybridisiert. Dabei wurden die Nylonmembranen mehrfach hybridisiert (eine Membran mit *psbA-10a*, *psbA-7* und *trnA* Sonden und eine Membran mit Sonden gegen *rbcl* und *rrn23*), dabei wurden die zuvor verwendeten Oligo-Sonden entfernt und durch Autoradiographie überprüft. Die Positionen der *psbA*-Oligonukleotid-Sonden sind in Abb. 28 ersichtlich. (B) Die *Dot-Blot*-Signale aus A wurden mit Hilfe der Quantity-One Software (Bio-Rad) quantifiziert und anschließend wurde der Quotient aus Präzipitat und Überstand berechnet. (C) Verwendete RNA-Spezies aus (A) wurden elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert und mit einer radioaktiven *psbA*-Sonde hybridisiert. Unfragmentierte RNA, welche nicht mit Fragmentierungspuffer versetzt wurde = gesamt cpRNA, unfragmentierte RNA versetzt mit Fragmentierungspuffer = unfrag. cpRNA.

Ergebnisse

lassen sich womöglich Schlussfolgerungen über bevorzugte Bindebereiche von CP33B innerhalb dieses Transkriptes ziehen. Die Präzipitat/Überstand-Quotienten für *psbA-10a* der unfragmentierten RNAs im Schnitt 2fach und der fragmentierten RNA im Schnitt 8fach gegenüber den Quotienten für *psbA-7* erhöht. Damit interagiert der Bereich des Oligonukleotides *psbA-10a* stärker mit CP33B als der von *psbA-7*. Dies steht im Widerspruch zu den RIP-Chip-Ergebnissen, in denen die Anreicherungsstärke für diese beiden Sonden umgekehrt ausfällt. Möglicherweise spielt die unterschiedliche Art der Markierung (Fluoreszenzfarbstoff/radioaktiv) beider Methoden und die unterschiedliche Art der Fixierung der Sonden (Glas/Nylon) hier eine Rolle. Abgesehen davon wurden die RIP-Chip Daten *ex vivo* gewonnen, wobei strukturelle Unterschiede in der RNA auftreten bzw. andere Proteine die Bindung beeinflussen können.

Zusätzlich wurde versucht, Oligonukleotide als Sonden zu nutzen, die im RIP-Chip die Maxima der Anreicherung repräsentieren (*psbA-12a*). Diese Hybridisierungen schlugen fehl, ohne dass eine technische Erklärung (z.B. Versagen der Markierungsreaktionen) gefunden werden konnte. Um die Bevorzugte Bindung von CP33B innerhalb des 3' Bereiches von *psbA* zu bestätigen ist eine Wiederholung der Experimente mit einer anderen Oligonukleotid-Sonde aus dem 3' Bereich ratsam.

Im weiteren Verlauf sollte überprüft werden, ob unfragmentierte Transkripte anderer RNAs im Vergleich zu den entsprechenden fragmentierten Transkripten ebenfalls stärker mit CP33B kopräzipitieren. Dafür wurden eine Oligonukleotid-Sonde für *rbcL* und eine PCR-Sonde für 23S rRNA verwendet. 23S rRNAs sind *in vivo* überwiegend in Ribosomen gebunden und laut RIP-Chip-Analysen auf Stromamaterial, kein Interaktionspartner von CP33B (vergleiche Abb. 8 und *Dot-Blot* für 23S rRNA). Jedoch können in den Präzipitaten der unfragmentierten RNAs geringe Anreicherungen der 23S rRNA detektiert werden. Möglicherweise ist CP33B auch *in vivo* in der Lage an die 23S rRNAs zu binden, jedoch könnte die Menge freier 23S rRNAs gegenüber der Anzahl an Ribosomen gebundener 23S rRNAs so unterrepräsentiert sein, dass sich keine Anreicherung nachweisen lässt.

Nach der Berechnung der Präzipitat/Überstand-Quotienten für *rbcL* und *rrn23* wird zunächst im Vergleich zu *psbA* deutlich, dass auch in diesem *in vitro* Versuch, die Bindung von CP33B an *psbA* am stärksten ist. Ansonsten zeigt sich das gleiche Phänomen wie zuvor, unfragmentierte RNAs von *rbcL* und 23S rRNA sind stärker in den CP33B-Präzipitaten angereichert als die fragmentierten RNAs.

Es bleibt zunächst offen ob CP33B tatsächlich besser an längere RNA-Fragmente bindet oder dieser Unterschied lediglich durch den experimentellen Ablauf zu Stande kommt. Womöglich

verfehlen die in den Northern-Analysen verwendeten Oligonukleotid-Sonden die eigentliche CP33B-Bindestelle im 3' Ende des ORFs (s. Abb. 28) und damit die kurzen RNA-Fragmente, welche an CP33B binden. Oder die RNA-Struktur wird, durch das Erhitzen während der Fragmentierung, so verändert, dass keine Interaktion mit CP33B mehr erfolgt. Die Verifizierung der Experimente durch die Anwendung eines anderen Fragmentierungs-Verfahrens (RNase oder Ultraschallbehandlung) ist unbedingt erforderlich. Auch können weitere Untersuchungen mit *in vitro* synthetisierten RNA-Fragmenten unterschiedlicher Länge hilfreich sein.

Falls CP33B jedoch tatsächlich besser mit langen RNAs interagiert als mit kurzen RNAs, dann sollte dieses Phänomen auch *in vivo* nachweisbar sein und womöglich für kurze monocistronische mRNAs gelten. Hierfür wurden die CP33B-RIP-Chip Daten näher betrachtet (s. Anhang Tabelle 6). Nur einige wenige RNAs existieren im Chloroplasten fast ausschließlich in monocistronischer Form (*psbA*, *rbcL*, *psbN*, und *psbM*), die Mehrheit liegt zusätzlich oder ausschließlich in polycistronischer Form vor (Sugita und Sugiura 1996). Daher lassen sich durch RIP-Chip-Analysen keine Aussagen über die anderen kurzen monocistronischen mRNAs treffen, da die RIP-Chip Methode nicht zwischen mono- und polycistronischen RNAs unterscheiden kann. Die Länge der *psbA* und *rbcL* mRNA beträgt über 1200 nt, dagegen sind *psbN* und *psbM* vergleichsweise kurz. Zwar ist durch die unbekannte Länge der UTR-Bereiche die genaue Länge von *psbN* und *psbM* unbekannt, doch liegt der kodierende Bereich deutlich unter 200 nt (*psbN* 132 nt und *psbM* 105 nt). Tatsächlich sind *psbN* und *psbM* im RIP-Chip von CP33B nur gering angereichert (s. Tabelle 2). Interessanterweise gilt das gleiche auch für die RIP-Chip Daten von CP33A (s. Teubner et al. 2017). So sind die mRNAs *psbA* und *rbcL* Ziel-RNAs von CP33A (s. Abb. 7), wogegen *psbN* und *psbM* geringere Anreicherungsgrade aufweisen.

Tabelle 2: Anreicherungsgrade von monocistronischen Transkripten (*psbA*, *rbcL*, *psbM* und *psbN*) aus verschiedenen RIP-Chip-Analysen. Dargestellt sind die Median(*Median of Ratios* (635/532)) von der CP33B-RIP-Chip-Analyse mit Stroma-Material (s. Kap. 3.2.3) sowie den CP33A-RIP-Chip-Analysen mit Stroma-Material (s. Kap. 3.2.2) und mit Gesamtpflanzenextrakten (s. Kap. 0).

	Median(Median of Ratios (635/532))						
	Stroma		Stroma		Gesamtpflanzenextrakt		
	CP33B	Kontrolle	CP33A	Kontrolle	CP33A +Puro	CP33A - Puro	IgG - Puro
<i>psbA</i>	19,294	0,2604	2,2075	0,512	4,994	1,422	0,335
<i>rbcL</i>	1,3665	0,44184	4,5825	0,044	4,041	1,309	0,471
<i>psbM</i>	0,2075	0,08652	1,2815	0,3975	1,535	0,841	0,429
<i>psbN</i>	0,246	0,42252	0,8235	0,073	1,955	0,831	0,419

4. Diskussion

4.1 CP33A ist essentiell für Chloroplasten und die pflanzliche Entwicklung

Das *CP33A* Gen ist auch als *PDE322* (*pigment-defective embryo 322*) bekannt, was für Chlorophyll-defiziente Samen steht und darauf hindeutet, dass CP33A schon während der Embryogenese an der Biogenese der Chloroplasten beteiligt sein könnte. Eigene Beobachtungen bestätigen dies, so besitzen ca. $\frac{1}{4}$ der sich entwickelnden Samen einer heterozygoten *cp33a-1*-Pflanze eine weiße bis hellgrüne Färbung (Daten nicht gezeigt). Anders als EMB-Mutanten (*embryo defective*, Bryant et al. 2011) sind die Samen homozygoter *cp33a*-Mutanten allerdings keimfähig. Wobei die Keimung nur nach Zugabe einer externen Kohlenstoffquelle erfolgt und selbst dann sind die Pflanzen durch starke Wachstumsdefekte gekennzeichnet (Abb. 10). Demnach ist CP33A vor allem während der Keimungsphase der Arabidopsis-Pflanzen von wichtiger Bedeutung. Damit übereinstimmend steigt die Expression von CP33A innerhalb der ersten 3 Tage stark an (Teubner et al. 2017).

Untersuchungen von Pflanzen mit Defekten in der plastidären Gen-Expression belegen, dass die Entwicklung der Plastiden einen Einfluss auf viele Aspekte der Pflanzenmorphologie hat. So ist der Aufbau eines funktionsfähigen photosynthetischen Apparates während der Blattentwicklung für den Übergang von Zellvermehrung zum Streckungswachstum der Blattzellen (Andriankaja et al 2012) und für die Ausbildung von Palisadengewebe notwendig (Legen et al. 2007). Die veränderte Morphologie des Sprosses und der Wurzeln in den *cp33a*-Mutanten, sowie deren atypische Blätter, sind somit weitere Indizien für eine Beteiligung von CP33A an der Gen-Expression im Chloroplasten. Zudem gibt es zunehmende Hinweise darauf, dass die Entwicklung der Blätter vor allem durch eine funktionsfähige plastidäre Translation reguliert wird (zusammengefasst in Tiller und Bock 2014, Moschopoulos et al. 2012), welche in den *cp33a*-Mutanten möglicherweise gestört ist (s. Kapitel 4.1.2).

Neben den makroskopischen Wachstumsdefekten, kommt es in den *cp33a*-Pflanzen zu zahlreichen Defekten auf molekularer Ebene. Dazu gehört die Reduktion vieler plastidärer mRNAs, welche zumindest zum Teil durch eine verminderte Aktivität der plastidär kodierten RNA-Polymerase (PEP) hervorgerufen wird (siehe 4.1.3), sowie die Destabilisierung langer Vorläufer-Transkripte (siehe 4.5) und eine Verminderung der Translation, welche vermutlich global ausgeprägt ist (siehe 4.1.2).

4.1.1 Wird der *cp33a*-Phänotyp durch einen primären Defekt oder multiple Defekte verursacht?

Aufgrund der pleiotropischen Defekte in den *cp33a*-Pflanzen, ist es schwierig die primäre/n Funktion/en von CP33A zu identifizieren. Vermutlich fungiert CP33A nach der Transkription und vor der Translation. Ein direkter Einfluss von CP33A an der Transkription seiner Ziel-RNAs ist unwahrscheinlich, da CP33A nicht mit Nukleoiden assoziiert (Abb. 5) und in *Run-on*-Analysen solch eine Beteiligung von anderen Vertretern der cpRNPs bisher nicht nachgewiesen werden konnte (Kupsch et al. 2012). Durch seine fehlende Polysomen-Assoziation scheint CP33A zudem kein konstitutiver Bestandteil des Translationsapparates zu sein (Abb. 9). Da andere cpRNP-Mitglieder nachweislich an verschiedenen RNA-Reifungsprozessen beteiligt sind (s. Kap. 1.4.1.1), ist für CP33A am ehesten eine Funktion innerhalb der posttranskriptionellen Modifizierung seiner Ziel-Transkripte anzunehmen.

Die starken phänotypischen Veränderungen der *cp33a*-Mutanten werden sehr wahrscheinlich nicht durch einen Defekt in der Reifung einer mRNA, die für eine Komponente des photosynthetischen Apparates kodiert, verursacht. So führen solche Defekte häufig zu keinem (Bsp. Edierung von *psbZ*, *ndhB* und *ndhF* durch OTP84, Hammani et al. 2009) oder höchstens einem albinotischen bis hellgrünen Phänotyp, ohne weitere morphologische Veränderungen (Bsp. Spleißen von *atpF* durch CRS1, Asakura und Barkan 2006; Prozessierung und Stabilisierung von *psbH* durch HCF107, Felder et al. 2001).

Wahrscheinlicher ist, dass der *cp33a*-Phänotyp durch fehlerhafte posttranskriptionelle Prozessierungen von essentiellen plastidären mRNA ausgelöst wird. So sind mehrere essentielle mRNAs Zieltranskripte von CP33A, dazu gehören mRNAs von ribosomalen Proteinen sowie *accD*, *clpP*, *ycf1* und *ycf2* (Abb. 7). Die Expression dieser mRNAs ist in den *cp33a*-Mutanten jedoch höchstens eingeschränkt, da eine komplette Blockierung embryolethal wäre (Scharff und Bock 2014, Kode et al. 2005, Kuroda und Maliga 2003, Shikanai et al. 2001, Drescher et al. 2000, Kikuchi et al 2013).

Nach den in dieser Arbeit durchgeführten qRT-PCR- und Northern-Analysen zeigt sich, dass vermutlich kein einzelner Defekt in einer der posttranskriptionellen Modifizierungen von *clpP*, *accD*, *ycf1* und *ycf2*, für den Phänotyp der *cp33a*-Mutanten sorgt. So wird in den *cp33a*-Pflanzen kein Fehler in der Stabilisierung, bzw. der intercistronischen oder End-Prozessierung der vier mRNAs sowie dem Spleißen der *clpP*-Introns detektiert. Alle reifen Transkripte akkumulieren zu ausreichenden Mengen und das in den Northern-Analysen beobachtete Transkriptmuster entspricht entweder dem Wildtyp (*accD*, *clpP*) oder den Spectinomycin-behandelten Pflanzen (*ycf1*, *ycf2*) (Abb. 12 und Abb. 14). Schon bekannte Mutanten der

Edierung von *clpP* (CLB19, Chateigner-Boutin et al. 2008) und *accD* (RARE1, Robbins et al. 2009, VAC1, Tseng et al. 2010) zeigen zwar zum Teil einen Chlorophyll-defizienten Phänotyp, entwickeln sich jedoch im Gegensatz zu den *cp33a*-Mutanten unter heterotrophen Anzuchtbedingungen bis zur Blüte.

Wie im nächsten Kapitel näher diskutiert, sind Fehler in der Reifung der mRNAs der ribosomalen Proteine eher verantwortlich für das Auslösen des *cp33a*-Phänotyps (Scharff und Bock 2014). So ist die Expression vieler dieser mRNAs essentiell und eine Translationsverminderung kann Auswirkungen auf die Morphologie der Pflanzen haben.

In der Vergangenheit konnte durch die Bestimmung der Ziel-RNAs von anderen RNA-Bindeproteinen, welche an der plastidären Gen-Expression beteiligt sind, deren Funktionen aufgeklärt werden (u.a. Schmitz-Linneweber et al. 2005, Beick et al. 2008, Stoppel et al. 2012). Da CP33A mit fast allen mRNAs interagiert (s. Kap. 3.2.2 und 4.3), ist in diesem Fall jedoch keine weitere Eingrenzung möglich. Das breite RNA-Bindespektrum könnte jedoch dafür sorgen, dass es in den *cp33a*-Mutanten zu einer Addition von mehreren einzelnen Defekten kommt. Eine Mutante der Alpha-Untereinheit von Chaperonin 60 ähnelnd phänotypisch den *cp33a*-Mutanten (Apuya et al. 2001). In diesen Mutanten liegt ein globaler Defekt in der Faltung vieler plastidärer Proteine vor. Da CP33A mit einem großen Spektrum an mRNAs interagiert, könnte die Summe aus vielen Defekten, was posttranskriptionelle Modifizierungen mehrerer nicht-essentieller mRNAs miteinschließt, zu dem beobachteten Phänotyp führen.

Zukünftige Studien mit hypomorphen Mutanten, könnten hilfreich sein um einzelne Defekte zu entschlüsseln. Die bereits durchgeführten Western- und Northern-Analysen auf Pflanzen mit reduzierten CP33A-Proteinmengen ergeben keine weiteren Hinweise auf die Funktion von CP33A (Anhang Abb. 6 und Abb. 11). Möglicherweise war die kleine Auswahl an getesteten Proteinen bzw. mRNAs unzureichend und eine globale Untersuchungen der Transkript- und Proteinmengen der hypomorphen *cp33a*-Pflanzen wären aufschlussreicher. Abgesehen davon hatten die untersuchten Pflanzen ein Alter von 14 Tagen. Da CP33A jedoch vor allem in den ersten Tagen der Keimung exprimiert wird (Teubner et al. 2017), könnte es vor allem in diesem Zeitraum zu detektierbaren Unterschieden zwischen hypomorphen Mutanten und Wildtyp-Pflanzen kommen.

4.1.2 Indizien und Ursachen einer globalen Verminderung der Translation in den *cp33a*-Mutanten

Der Chlorophyll-defiziente Phänotyp der *cp33a*-Pflanzen ist an sich schon ein Hinweis für eine starke Reduktion der Proteine des Photosystem I und II (Pontier et al. 2007, Eichacker et al. 1996). Dies wird durch Western-Analysen innerhalb dieser Arbeit bestätigt. Abgesehen davon führt der Knockout von CP33A zu einer starken Reduktion von Proteinen des Cytochrom-b6f-Komplexes und der ATP-Synthase (Abb. 11).

Die Reduktion aller untersuchten Komplexe der Photosynthese sprechen möglicherweise für eine globale Reduzierung der plastidären Translation. Diese kann in den *cp33a*-Mutanten jedoch nicht komplett gehemmt sein, zum einen wäre dies embryolethal (Tiller und Bock 2014) und zum anderen werden geringe Mengen der plastidären Proteine PetA und AtpA in den *cp33a*-Pflanzen detektiert (Abb. 11). Die Transkriptmengen aller untersuchten plastidären Proteine sind verringert (Abb. qRT-PCR bzw. Northern-Analysen). Untersuchungen von Proteinen, deren Transkripte in den *cp33a*-Pflanzen nicht reduziert sind, stehen allerdings noch aus (z.B. *clpP*, *rpl20*, *rpoC1*). Es bleibt somit offen, ob tatsächlich alle plastidären Proteine in den *cp33a*-Mutanten reduziert sind oder nur ein Anteil. Im Folgenden werden einige Indizien aufgeführt, die darauf hindeuten, dass in den *cp33a*-Mutanten die gesamte plastidäre Translation vermindert sein könnte.

Erstens: Die Reduktion der 16S rRNA. Ribosomale RNAs sind nur stabil, wenn sie in den ribosomalen Untereinheiten eingebaut sind. Damit dient die rRNA Akkumulation als indirektes Maß für den Ribosomen-Gehalt in Chloroplasten (Walter et al. 2010). Die starke Reduktion der 16S rRNA lässt sich in den *cp33a*-Mutanten zum Teil durch die reduzierte PEP-Aktivität erklären (s. Kap. 4.1.3). Jedoch ist die Menge der 16S rRNA und damit auch die Anzahl aktiver Ribosomen in den *cp33a*-Pflanzen stärker reduziert, als in verschiedenen PEP-defizienten Mutanten. So zeigen Northern-Analysen mit $\Delta rpoC1$ - und *pdm1/sell* Pflanzen (ein PPR Protein, welches für intercistronische Prozessierung von *rpoA* notwendig ist) ein eindeutiges Signal der reifen 16S rRNA (De Santis-Maciossek et al. 1999, Pyo et al. 2013), wogegen in Northern-Analysen in dieser Studie nur das 1,7 knt lange Vorläufer-Transkript erkennbar ist (Abb. 13). Ein direkter Einfluss von CP33A auf die Stabilität der 16S rRNA ist nicht anzunehmen, da diese rRNA keines der Zieltranskripte von CP33A darstellt.

Zweitens: *cp33a*-Mutanten ähneln auf Protein- und Transkript-Ebene den Spectinomycin-behandelten Pflanzen und damit Pflanzen in denen eine Translations-Hemmung vorliegt. In beiden Gewebetypen sind alle untersuchten Proteine gleichstark reduziert (Abb. 11). Ähnliche Übereinstimmungen gelten für die Mengen der 16S und 23S rRNAs, sowie des gesamten

Transkriptomprofils (s. Kap. 3.4.3). Dagegen weisen Norflurazon-behandelte Pflanzen, in denen die Chloroplasten-Biogenese gestört ist, aber keine Hemmung der Translation vorliegt, Unterschiede zu den *cp33a*-Pflanzen auf (Abb. 13). Drittens: Die veränderte Blattmorphologie der *cp33a*-Mutanten ist ein Indiz für eine globale Reduktion der Translation. Einige Beispiele von Mutanten, deren plastidäre Translation dysfunktional ist und deren Blätter eine veränderte Form aufweisen sind: *trnC-GCA*, *trnN-GUU* (Legen et al 2007), *rpl36* (Fleischmann et al. 2011), EDD1 eine Glycyl-tRNA-Synthetase (Moschopoulos et al. 2012) und EMB2654 ein PPR-Protein nötig für das trans-Spleißen von *rps12* (Aryamanesh et al. 2017). Verschiedene PEP-defiziente Mutanten, in denen die Translation teilweise, aber nicht global reduziert ist und plastidäre Mutanten, in denen ausschließlich die Photosynthese betroffen ist, zeigen dagegen keine veränderte Blattform (zusammengefasst in Tiller und Bock 2014).

Um den Einfluss von CP33A auf die plastidäre Translation zu verifizieren, könnten hypomorphe *cp33a-2* Pflanzen genutzt werden. So kann die Anzucht von *cp33a-2* Pflanzen auf Medium mit einer geringen Spectinomycin-Konzentration, bei der Wildtyp-Pflanzen noch ergrünen, beim Auftreten eines albinotischen Phänotyps ein Indiz für einen Translationsdefekt darstellen.

Im restlichen Teil dieses Kapitels wird auf die möglichen Ursachen einer globalen Translationsverminderung in den *cp33a*-Mutanten eingegangen. Ein direkter Einfluss von CP33A auf die Biogenese des Translations-Apparates ist unwahrscheinlich. So wird CP33A nicht innerhalb der Polysomenfraktionen detektiert und assoziiert höchstens schwach mit rRNAs (Abb. 9 und Abb. 7). Unklar ist bisher, ob CP33A eine potentielle Funktion innerhalb der Translationsinitiation seiner Ziel-RNAs übernimmt, welche auch ohne Polysomenassoziation möglich ist. So sind RNA-Bindeproteine bekannt, die für die Translation ihrer Ziel-Transkripte nötig sind, aber nicht mit Polysomen assoziieren (z.B. Tab2 für *psaB*; Dauvillee et al. 2003). Auch der Ausfall bestimmter tRNAs kann zu einer gestörten Translation führen (Legen et al. 2007, Rogalski et al. 2008). Die tRNAs sind jedoch keine oder nur schwache Ziel-RNAs von CP33A.

Dagegen sind mRNAs der ribosomalen Proteine (rProteine) Interaktionspartner von CP33A (Abb. 7) und daher ist eine verminderte Translation in den *cp33a*-Mutanten am ehesten durch eine Störung der Reifungs-Prozesse dieser mRNAs zu erklären. Jedoch ist eine Beteiligung von CP33A an der Edierung oder am Spleißen der rProtein mRNAs, als mögliche Ursache, entweder ausgeschlossen oder unwahrscheinlich. So führen schon bekannte Edierungsdefekte ribosomaler Transkripte zu keinem Translationsdefekt (OTP86 für *rps14*, OTP80 für *rpl23*

und OTP81 für *rps12* Hammani et al. 2009) und die gespleißten Transkripte (*rps12*, *rpl2* und *rpl16*) sind in den *cp33a*-Mutanten nicht oder nur unwesentlich reduziert (Abb. 15).

Wahrscheinlicher ist, dass CP33A an der Stabilisierung und damit auch an der intercistronischen Prozessierung einer polycistronischen mRNA, welche für rProteine kodiert, beteiligt ist und solch ein Defekt zu einer Reduktion der plastidären Proteinsynthese führt. Wie in Kap. 4.5 diskutiert scheint CP33A einen stabilisierenden Effekt auf lange Vorläufer-Transkripte auszuüben. Insbesondere die *rps8*-Vorläufer sind in der *cp33a*-Mutante stark gegenüber den Spectinomycin-behandelten Pflanzen reduziert. *rps8* ist Teil des *rpl23* Genclusters (L23-L2-S19-L22-S3-L16-L14-S8-L36-S11-rpoA). Möglicherweise führt die Destabilisierung der polycistronischen *rpl23* RNA zu einer Reduktion einzelner mRNAs dieses Operons. Wobei nicht alle mRNAs betroffen sind, so sind kürzere *rps8* Prozessierungs-Produkte auf Wildtyp-Niveau (Abb. 14), was durch die qRT-PCR Daten bestätigt wird. Dagegen sind andere mRNAs ribosomaler Proteinen in den qRT-PCR Analysen gegenüber dem Wildtyp reduziert (*rpl23*, *rpl2*, *rpl33*, Abb. 12). In einer homozygoten Mutante der Endoribonuklease E (RNaseE) führt ein Defekt in der intercistronischen Prozessierung der polycistronischen *rpl23* RNA zu einer starken Reduktion des reifen *rpl22* Transkripts und infolgedessen zu einem Mangel an plastidären Ribosomen (Walter et al. 2010).

Insgesamt ist die Beteiligung von CP33A an der Stabilisierung einzelner mRNAs ribosomaler Proteine als mögliche Ursache einer Translationsverminderung am wahrscheinlichsten und müsste in Zukunft näher untersucht werden.

4.1.3 Der Verlust von CP33A führt zu einer verminderten PEP-Aktivität

Spectinomycin ist ein Antibiotikum welches an die 16S rRNA bindet und so die plastidäre Translation verhindert (Moazed und Noller 1987). Aufgrund der fehlenden Synthese der im Chloroplast kodierten RNA-Polymerase (PEP, plastidär kodierte plastidäre RNA-Polymerase) kommt es in Spectinomycin-behandelten Pflanzen sowie in anderen Pflanzen mit einer reduzierten plastidären Translation (Aryamanesh et al. 2017) zu einem typischen Transkriptionsmuster von PEP-defizienten Mutanten. Dieses Muster beinhaltet eine Reduktion von Transkripten, die für Proteine des Photosynthese-Apparates kodieren und durch die PEP transkribiert werden und eine normale bzw. stimulierte Transkription von Genen abgelesen durch die NEP (nukleär kodierte plastidäre RNA-Polymerase) (Hajdukiewicz et al. 1997, Legen et al. 2002, Chateigner-Boutin et al. 2008, Pfalz et al. 2006). Das Transkriptmuster der *cp33a*-Mutanten ähnelnd nur zum Teil diesem typischen Muster PEP-defizienter Mutanten. So führt der Verlust von CP33A zwar auch zu einer Reduktion

aller durch die PEP transkribierten RNAs, wogegen der Anstieg vieler durch die NEP gebildeter Transkripte fehlt (Abb. 12).

Dennoch scheint die Aktivität der NEP auch in den *cp33a*-Mutanten stimuliert zu sein. So sind NEP transkribierte Vorläufer-RNAs in den *cp33a*-Mutanten als auch in den Spectinomycin-behandelten Pflanzen stärker angereichert als in den Wildtyp-Pflanzen (*rps2*, *clpP*, *rps15*, *rpoC1* und *ndhB*, Abb. 14). Einige der Vorläufer-Transkripte fehlen dabei in den Wildtyp-Pflanzen bzw. sind kaum detektierbar. Das gleiche Phänomen tritt auch in anderen PEP-defekten Mutanten auf (Legen et al. 2002, Chateigner-Boutin et al. 2008). Vermutlich werden diese Vorläufer-RNAs bei einem PEP-Defekt von weiter stromaufwärts liegenden NEP-Promotoren abgelesen (Zhelyazkova et al. 2012, Pfalz et al. 2006).

Neben dem Anstieg der NEP-abhängigen Vorläufer-Transkripte, ähnelnd sich zudem das gesamte Transkriptomprofil der *cp33a*-Pflanzen und der Spectinomycin-behandelten Pflanzen, bis auf eine Verschiebung nach unten. Dies alles sind Indizien für eine stimulierte NEP-Aktivität, welche in den *cp33a*-Mutanten gleichzeitig von der Destabilisierung vieler Transkripte überlagert wird (s. Kap.4.5).

Wie genau wird die Aktivität der NEP gesteigert? Der Ablauf und die genauen Ursachen sind noch nicht geklärt und teilweise umstritten (Bohne et al. 2009). Als allgemein anerkannt gilt jedoch, dass eine Verminderung der PEP-Aktivität zu einer Stimulation der NEP führt. Dies wurde bereits in zahlreichen Mutanten dargelegt (Legen et al. 2002, Chateigner-Boutin et al. 2008, Pfalz et al. 2006, Zhou et al. 2009).

Im Folgenden werden mögliche Ursachen für eine gestörte PEP-Aktivität in den *cp33a*-Mutanten erläutert. Grundsätzlich kann ein PEP-Defekt direkt oder indirekt entstehen. Indirekt führt eine defiziente Translation zu einem PEP-Defekt, da die Synthese der PEP reduziert ist, ähnlich wie in Spectinomycin-behandelten Pflanzen oder Mutanten von ribosomalen Proteinen (Aryamanesh et al. 2017). Im vorherigen Kapitel sind Indizien und Ursachen für eine verminderte Translation in den *cp33a*-Mutanten beschrieben, wobei vermutlich vor allem Prozessierungsdefekte von mRNAs ribosomaler Proteine eine Rolle spielen (s. Kap.4.1.2).

Eine PEP-Defizienz könnte auch durch den direkten Einfluss von CP33A auf die Genexpression der PEP-Untereinheiten hervorgerufen werden. Da CP33A mit den vier PEP kodierenden mRNAs *rpoB*, *rpoC1*, *rpoC2* und *rpoA* interagiert (Abb. 7) und cpRNPs nachweislich an verschiedenen RNA-Reifungsprozessen beteiligt sind (s. Kap. 1.4.1.1), wäre ein direkter Einfluss auf die vier mRNAs über posttranskriptionelle Prozesse vorstellbar. Womöglich führt ein Fehler in der Edierung von *rpoA* bzw. *rpoB* zu dem PEP-defizienten

Phänotyp, ähnlich wie in schon bekannten Mutanten (*clb19* Chateigner-Boutin et al. 2008; *ysl* Zhou et al. 2009). In der Mutante des PPR Proteins PDM1 wird eine fehlerhafte intercistronische Prozessierung der *rpoA* mRNA angenommen. Mutanten zeigen neben einer verminderten PEP-Aktivität auch einen albinotischen Phänotyp und sterben nach der Bildung der Kotyledonen ab (Wu und Zhang 2010, Yin et al. 2012). Da es sich bei der intercistronischen Prozessierung eher um ein Defekt in der Stabilisierung von Transkripten bzw. deren Enden handelt, könnte eine Destabilisierung von *rpoA* und/oder *rpoB* Transkripten in den *cp33a*-Mutanten als Ursache für einen PEP-Defekt in Frage kommen.

Weitere Untersuchungen der einzelnen *rpo*-mRNAs auf Prozessierungsdefekte in den *cp33a*-Mutanten, wie z.B. durch Northern und Edierungs-Analysen, sind nötig, um die Ursache der verminderten PEP-Aktivität letztendlich zu klären.

4.2 CP33B ist unter Standardbedingungen nicht essentiell für die pflanzliche Entwicklung

Die starke Akkumulation von CP33B in reifen Chloroplasten (Abb. 4) und seine Interaktion mit zahlreichen mRNAs (Abb. 8) belegen, dass auch CP33B eine Rolle im RNA-Metabolismus des Chloroplasten spielt. Welche genaue Funktion es dabei übernimmt, ist noch unklar. So führt der Verlust von CP33B unter Standardwachstumsbedingungen zu keinen makroskopischen und nur zu minimalen Veränderungen auf molekularer Ebene. Im Folgenden werden zunächst die Negativ-Resultate, der in dieser Studie mit den *cp33b*-Mutanten durchgeführten Untersuchungen zusammengefasst und anschließend über mögliche Ursachen für das Fehlen eines identifizierbaren Defektes spekuliert.

Insgesamt kann kein essentieller Einfluss von CP33B auf die Edierung (Abb. 23), das Spleißen (Abb. 22) oder die Stabilisierung (Abb. 21) seiner Zieltranskripte identifiziert werden. In einem Pilotexperiment sind einige plastidäre Proteine minimal gegenüber den Wildtyp-Pflanzen reduziert (Abb. 18). Die entsprechenden Transkriptmengen (*atpA*, *rbcL* und *ndhH*) sind in den *cp33b*-Mutanten jedoch unverändert und zeigen eher eine tendenzielle Steigerung im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 21). Möglicherweise sind dies erste Indizien für einen schwachen Translationsdefekt in den *cp33b*-Mutanten. Eine Wiederholung der Western-Analysen mit weiteren biologischen Replikaten ist erforderlich, um die Signifikanz der gemessenen Unterschiede zu ermitteln.

Da CP33B mit dem Hauptteil der *psbA* mRNA im Stroma interagiert, wurde in einigen Versuchen speziell *psbA* bzw. dessen kodierendes Protein D1 untersucht. Aus diesen

Diskussion

Untersuchungen ergibt sich, dass CP33B weder einen essentiellen Einfluss auf die Lokalisierung der *psbA* mRNA innerhalb der Chloroplasten ausübt (Abb. 26) noch entscheidend für dessen Translationsinitiation ist (Abb. 24). Übereinstimmend mit letzterem Ergebnis kommt es in den *cp33b*-Mutanten zu keinen Veränderungen der D1-Proteinmengen (Abb. 19).

Interessanterweise zeigt *psbA* in den qRT-PCR Analysen der drei Tage alten *cp33b*-Keimlinge von allen untersuchten Transkripten die stärkste Reduktion (Abb. 21). Auch wenn diese Reduktion aufgrund der leichten Varianz der Replikate und der geringen Veränderung unter den gewählten Signifikanzgrenzwerten liegt, könnte diese Tendenz ein erster Hinweis auf eine Beteiligung von CP33B an der Stabilisierung von *psbA* sein. Zumindest *in vitro* sind cpRNPs aus Tabak und Spinat an der Stabilisierung von *psbA* beteiligt (Hayes et al. 1996, Nakamura et al. 2001). Möglicherweise existieren im Chloroplasten Mechanismen die dem Fehlen von CP33B entgegenwirken und für die Aufrechterhaltung der *psbA*-Transkriptmengen sorgen. So könnten die Halbwertszeit und die Transkriptraten von *psbA* in der Mutante erhöht sein.

Abgesehen davon könnten Redundanzen mit anderen cpRNPs der Grund für die minimale Reduktion der *psbA* mRNA und allgemein für das Fehlen molekularer und makroskopischer Defekte in den *cp33b*-Mutanten sein. In den von Nakamura et al. (2001) durchgeführten Untersuchungen mit Tabak konnte jede Gruppe (Gruppe I: CP29A und CP29B; Gruppe II CP28A und CP31; Gruppe III: CP33) die Halbwertszeit der *in vitro* synthetisierten *psbA* mRNA individuell in einem geringen Maße verlängern. Eine Kombination aller fünf cpRNPs bewirkte jedoch den größten stabilisierenden Effekt (Nakamura et al. 2001). Es ist gut vorstellbar, dass auch in Arabidopsis die Stabilität von *psbA* und anderen Transkripten durch solch ein Zusammenspiel der cpRNPs bestimmt wird. Unter anderem führt der doppelte Knockout von CP29A und CP31A aus Arabidopsis unter Kälteeinwirkung zu einer erhöhten Reduktion von bestimmten Transkripten im Vergleich zu den Einzelmutanten (Kupsch et al. 2012). Außerdem wurden Redundanzen für CP31A und CP31B innerhalb der Edierung plastidärer Transkripte beschrieben (Tillich et al. 2009).

Phylogenetische Analysen von CP33B deuten auf eine engere Verwandtschaft mit CP33C hin (Ruwe et al. 2011). Des Weiteren wird CP33B mit zwei Mitgliedern der cpRNPs koexprimiert, CP29C (PSRP2) und CP28B (Datenbank ATTED II; Obayashi et al. 2018). Möglicherweise kann eines dieser cpRNPs CP33B funktionell ersetzen.

Zusätzlich könnte die Funktion von CP33B unter bestimmten Stressbedingungen an Bedeutung zunehmen. So wurde eine Beteiligung von anderen Mitgliedern der cpRNPs in der Antwort auf verschiedene Stressauslöser bereits belegt. Aufgrund der starken Assoziation von

CP33B mit *psbA*, welches für das lichtempfindliche D1-Protein kodiert, ist ein Einfluss von CP33B unter Lichtstressbedingungen gut vorstellbar. Jedoch ist sowohl das Wachstum der *cp33b*-Pflanzen unter Lichtstress und fluktuierenden Lichtbedingungen (s. Kap. 3.6.2) als auch das Proteinlevel von D1 nach der Einwirkung drei verschiedener Lichtbedingungen (Anhang Abb. 9) gegenüber Wildtyp-Pflanzen nicht verändert. Für andere cpRNPs wurde eine Beteiligung in der Kältetoleranz beschrieben (CP31A und CP29A in Kupsch et al. 2012) bzw. vorgeschlagen (CP29C in Xu et al. 2013), doch auch unter Kälteeinwirkung ergeben sich für die *cp33b*-Pflanzen keine phänotypischen Veränderungen gegenüber dem Wildtyp. Womöglich wird CP33B unter bisher noch nicht untersuchten Stressbedingungen für den RNA-Metabolismus der Chloroplasten essentiell. So ist CP29C neben Kälte auch in der Antwort auf Salz- und Dehydrationsstress beteiligt (Xu et al. 2013).

Um letztendlich die Funktion von CP33B aufzuklären, sind zukünftige Untersuchungen mit *cp33b*-Doppel- bzw. Tripelmutanten und die Anzucht unter weiteren Stressbedingungen ratsam.

4.3 CP33A und CP33B sind globale RNA-Bindeproteine

Das Bindespektrum von verschiedenen RNA-Bindeproteinen (RBP) kann erheblich variieren. So existieren RBPs die mehr als 1000 verschiedene RNAs binden können und welche die mit wenigen, z.B. mit nur zwei verschiedenen RNAs interagieren (Hogan et al. 2008). In höheren Pflanzen besitzen die PPR-Proteine, welche die abundanteste Familie der RNA-Bindeproteine in Chloroplasten darstellen, ein kleines Zielspektrum von nur einem bis wenigen Transkript/en (Schmitz-Linneweber et al. 2005, Schmitz-Linneweber et al. 2006, Beick et al. 2008, Barkan und Small 2014). Die cpRNPs interagieren dagegen ähnlich ihrem nukleocytoplasmatischem Verwandten hnRNP A1 mit einer Vielzahl an RNAs (Jean-Philippe et al. 2013), so dargestellt für CP31A und CP29A aus *Arabidopsis* (Kupsch et al. 2012).

In dieser Studie wurden die RNA-Ziele zweier weiterer Mitglieder der cpRNPs (CP33A und CP33B) aus *Arabidopsis thaliana* untersucht. So assoziieren CP33A und CP33B ebenfalls mit dem Großteil der chloroplastidären mRNAs und zeigen nur eine geringe bzw. keine Anreicherungen der ribosomalen RNAs und der meisten tRNAs (Abb. 7 und Abb. 8). Auch cpRNPs aus Tabak assoziieren nur schwach mit der 23S rRNA (Nakamura et al. 2001) und intronlosen tRNAs *in vivo* (Nakamura et al. 1999).

Die RNA-Interaktion von CP33A und CP33B ist sehr wahrscheinlich direkt und ohne weitere Hilfsproteine. Zum einen belegen dies ältere Studien mit Tabak (Li und Sugiura 1991, Ye und

Sugiura 1992) und die innerhalb dieser Arbeit durgeführten *in vitro* Bindestudien mit rekombinanten CP33B, in denen CP33B ohne die Anwesenheit weiterer Proteine mit RNAs assoziiert (Abb. 29, Kap. 3.7.2).

CP33A interagiert, neben wenigen Ausnahmen, mit allen mRNAs. Neben einer allgemeinen und unspezifischen Bindung aller Transkripte, lassen sich für CP33A Präferenzen für bestimmte mRNAs identifizieren (Abb. 7). Solche Spezifitäten der RNA-Interaktion existieren auch für CP33B, wie z.B. im Fall von *psbA* (mehr zu Präferenzen der RNA-Bindung von CP33A und CP33B im nächsten Kap. 4.3.1). Insgesamt ist das RNA-Bindespektrum von CP33B im Vergleich zu CP33A weitaus schmalere, scheint sich jedoch *in vitro* zu erweitern. So kopräzipitiert die 23S rRNA *in vitro* mit CP33B, aber nicht *in vivo* (vergleiche Abb. 8 und Abb. 29). Der Großteil der 23S rRNA liegt nicht frei im Stroma sondern Ribosomen-gebunden vor (Nakamura et al. 1999). Da rRNAs in Ribosomen überwiegend gefaltet und mit Proteinen bedeckt vorliegen, finden CP33A und CP33B vermutlich keinen sterischen Zugang zu rRNAs. In dem durgeführten *in vitro* Ansatz fehlen jedoch Ribosomen und andere Proteine, dadurch ist die 23S rRNA für CP33B frei zugänglich. Womöglich sind die cpRNPs *in vitro* in der Lage, mit einem noch größeren Spektrum an RNAs zu interagieren, wogegen die RNA-Assoziation *in vivo* durch andere Proteine und Faktoren eingeschränkt bzw. spezifiziert wird.

Insgesamt sind die Ergebnisse, der in dieser Arbeit durgeführten *in vivo* Analysen, ein Beweis für das globale Bindeverhalten der cpRNPs. Zu den global wirkenden RBPs im Chloroplasten zählen u.a. auch RNasen und Ribosomen (Zoschke et al. 2013, Stoppel et al. 2012). Allen gemeinsam ist ihre hohe Abundanz. So ist die Anzahl der cpRNPs und der Ribosomen in einem Chloroplast ungefähr gleich hoch (Nakamura et al. 2001). Dass Ribosomen und RNasen ein breites Spektrum an RNA-Zielen aufweisen, ist offensichtlich funktionell sinnvoll. Sehr wahrscheinlich üben auch die cpRNPs eine recht allgemeine Funktion aus, die viele/alle mRNAs betreffen, welches in weiteren Kapiteln näher beleuchtet wird (s. Kap. 4.5 und 4.6).

4.3.1 Neben einer globalen mRNA-Bindfähigkeit besitzen CP33A und CP33B Sequenzpräferenzen

Wie im vorherigen Kapitel diskutiert, gehören die cpRNPs zu den RNA-Bindeproteinen mit einem breiten Spektrum an RNA-Zielen. Dies bedeutet nicht, dass es keine Sequenzpräferenzen geben würde. Schon früh wurden *in vitro* erste Spezifitäten für PolyU- und PolyG-Stränge beobachtet (Li und Sugiura 1991, Ye und Sugiura 1992, Lisitsky et al.

1995). Einige Jahre später konnte eine spezifische RNA-Bindung für bestimmte plastidäre Transkripte nachgewiesen werden. So hat CP33 aus Tabak eine Präferenz für *psbA* und *rbcL*, wogegen *petD* nur schwach assoziiert ist (Nakamura et al. 1999). Auch CP33A und CP33B interagieren *in vivo* nicht mit gleicher Effizienz mit allen RNAs. Beide cpRNPs besitzen neben vielen gemeinsamen RNA-Zielen (mRNAs des Photosystems II, Photosystem I, der ATP-Synthase und des NDH-Komplexes) auch einige spezifische bzw. präferierte Ziele. Durch die RIP-Chip-Analysen ist es möglich die Ziel-Transkripte der cpRNPs zu identifizieren. Um jedoch quantitative Aussagen zu treffen, wurden *Dot-Blot*-Analysen durchgeführt. Interessanterweise sind genau *psbF* und *rbcL*, von denen über 50% des im Stroma befindlichen Anteils mit CP33A kopräzipitieren, entweder kein (*psbF*) oder ein schwacher (*rbcL*) Interaktionspartner von CP33B (vergleiche Abb. 7 und Abb. 8). Die *psbA* mRNA ist dagegen das Hauptziel von CP33B (90%ige Anreicherung im Präzipitat) und ein schwaches Ziel von CP33A. Der Oligonukleotid RIP-Chip für CP33B belegt zudem eine präferierte Bindestelle innerhalb des 3'Ende von *psbA* (Abb. 28). Auch für andere cpRNPs, CP31A und CP29A konnten bereits neben überlappenden RNA-Zielen, Spezifitäten identifiziert werden. So weist CP31A eine Präferenz für *ndhF*, insbesondere der 3'UTR, auf (Kupsch et al. 2012).

Wodurch könnten die Sequenzpräferenzen der cpRNPs zustande kommen? Die RRM-Domänen könnten dafür verantwortlich sein. Neben den konservierten RNP-Motiven, ist der Großteil der restlichen Aminosäuren innerhalb der RRM-Domänen der verschiedenen cpRNP-Mitgliedern aus Arabidopsis weniger stark konserviert (Ruwe et al. 2011). Zudem wurde in mehreren Fällen gezeigt, dass in RNA-Bindeproteinen mit RRM-Domänen, die Regionen außerhalb der RRMs die Affinität der RNA-Bindung erhöhen können und eine Rolle bei der Sequenzspezifität spielen (zusammengefasst in Clery and Allain 2011). Im Fall der cpRNPs könnten somit die saure Domäne, der Bereich zwischen den beiden RRM-Motiven (die Linkerregion) und der C-Terminus einen Einfluss auf die Bindesepezifität ausüben. Des Weiteren könnte die Interaktion mit anderen Proteinen für die Präferenz bestimmter Sequenzen entscheidend sein. So wird die Affinität und Spezifität der RNA-Bindung des strukturell den cpRNPs ähnlichen, zwei RRM-Domänen tragenden snRNP Protein U2-B“ durch Protein-Protein Interaktionen moduliert (Scherly et al. 1990). Es wird spekuliert, dass die saure Domäne der cpRNPs für Protein-Protein Interaktionen fungieren könnte (Bandziulis et al. 1989). Mögliche Kandidaten für Protein-Interaktionen in Chloroplasten sind die zahlreichen PPR-Proteine, welche hochspezifisch an bestimmte Sequenzmotive binden können (Barkan und Small 2014), experimentelle Nachweise dafür stehen allerdings noch aus.

Zusätzlich könnte die Bindspezifität der cpRNPs durch verschiedene posttranslationale Modifikationen beeinflusst werden. So werden cpRNPs nachweislich phosphoryliert (Lisitsky und Schuster 1995, Loza-Tavera et al. 2006), acetyliert (Wang et al. 2006) und treten als Oligomere (Nakamura et al. 2001) auf. In einer großen Untersuchung des Phosphoproteoms von *Arabidopsis* wurde CP33B bereits identifiziert (Reiland et al. 2009). Andere Modifizierungen für CP33A und CP33B sind experimentell noch nachzuweisen.

Auch die RNA-Sekundärstruktur könnte eine Rolle bei der spezifischen Erkennung durch die cpRNPs spielen. Aufgrund der geringen Assoziation mit tRNAs, rRNAs und Intron-Bereichen, welche stärker strukturiert sind als kodierende Bereiche, wurde für CP29A und CP31A eine schwache Bindung an stark strukturierte RNAs spekuliert (Kupsch et al. 2012). In dieser Arbeit konnte dies nur zum Teil bestätigt werden, so wurde eine Interaktion von CP33B mit nicht-kodierenden Regionen einiger mRNAs festgestellt (s. Abb. 27) und die 23S rRNA wird *in vitro* von CP33B gebunden. Jedoch kopräzipitiert nur ein sehr geringer Anteil der 23S rRNA mit CP33B und *trnA* weist gar keine Interaktion mit CP33B *in vitro* auf (Abb. 29). Ein Einfluss der RNA-Sekundärstruktur auf die Assoziation der cpRNPs mit RNAs, ist damit weiterhin gut vorstellbar.

4.3.2 cpRNPs interagieren mit ihren Ziel-Transkripten über multiple Bindestellen

Wie bereits dargestellt interagieren cpRNPs mit vielen mRNAs, doch wo genau erfolgt die Bindung innerhalb eines Ziel-Transkriptes und lassen sich womöglich Bindemotive identifizieren? Um diese Fragen beantworten zu können, sollten die Bindestellen von CP33B näher eingeeengt werden. In der Vergangenheit wurden mit Hilfe eines Oligonukleotid-*Microarrays* bzw. durch vergleichbare Untersuchungen (Oligonukleotidsonden auf *Slot-Blots* von IP-Fraktionen) die Bindemotive des Spleißfaktors MatK (Zoschke et al. 2010) und verschiedener PPR-Proteine entschlüsselt (Schmitz-Linneweber et al. 2006, Pfalz et al. 2009). Nach der Durchführung einer CP33B RIP-Chip-Analyse und der Hybridisierung auf einem Oligonukleotid-*Microarrays* kam es jedoch zu keiner Anreicherung von vereinzelt, kurzen Sequenzabschnitten, sondern zu einer Anreicherung fast aller Transkriptabschnitte der untersuchten Ziel-RNAs (*psbA*, *ndhB*, *psaA/psaB/rps14*, *ndhF* und *psbD/psbC*, Abb. 27). Dies deutet insgesamt auf multiple CP33B-Bindestellen innerhalb seiner Ziel-Transkripte hin. Damit übereinstimmend wird bei Ko-Immunopräzipitationen von CP33B das Vollängenkonstrukt von *psbA* identifiziert, wogegen im Fall von MatK RNA-Fragmente mit einer Länge von ~200 nt bis ~500 nt und keine *trnK*-Vorläufertranskripte (~ 2,8 knt) kopräzipitieren (Zoschke et al. 2010).

Die Assoziation von cpRNPs mit multiplen Bindestellen konnte auch *in vivo* für CP29A und CP31A aus Arabidopsis, und *in vitro* für 28RNP aus Spinat, belegt werden (Kupsch et al. 2012, Lisitsky et al. 1995). 28RNP interagiert mit Bereichen der kodierenden Regionen sowie den 3' und 5'UTRs verschiedener mRNAs. Diese RNA-Assoziation der cpRNPs über mehrere Bindestellen ist im Einklang mit ihrem allgemeinen und globalen Bindevverhalten, welches gegensätzlich zu dem spezifischen Bindevverhalten der PPR-Proteine steht. PPR-Proteine interagieren nicht nur mit wenigen Transkripten, sondern innerhalb dieser mit einem einzelnen Bindemotiv (Barkan und Small 2014).

4.4 Werden lange Transkripte von cpRNPs bevorzugt?

Innerhalb der *in vitro* Bindestudie mit rekombinanten CP33B wurde unfragmentierte RNA wesentlich besser von CP33B gebunden als fragmentierte RNA. Die Länge der fragmentierten RNA betrug ~200nt (Abb. 29). In verschiedenen *in vitro* Studien interagierten cpRNPs mit Nukleinsäure-Fragmenten kleiner als 200nt (Li und Sugiura 1991, Lisitsky et al. 1994, Lisitsky et al. 1995). Dies macht die Ergebnisse aus dieser Arbeit dennoch nicht ungültig. So wurde in dieser Arbeit isolierte Gesamt-RNA aus Chloroplasten verwendet, wogegen in den älteren Studien die Nukleinsäuren *in vitro* synthetisiert wurden und kein Vergleich mit wesentlich längeren Fragmenten erfolgte.

Interessanterweise sind kurze mRNAs, die hauptsächlich in monocistronischer Form vorkommen (*psbM* und *psbN*), in den RIP-Chip-Analysen von CP33B und CP33A tatsächlich gar nicht bzw. gering angereichert (s. Tabelle 2). Dies wäre ein erstes Indiz, dass es sich bei der Bevorzugung der cpRNPs für lange Transkripte um ein tatsächliches *in vivo* Phänomen handeln könnte. Northern-Analysen von polycistronischen RNAs (z.B. *atpI-atpH-atpF-atpA* oder *psbB-psbT-psbH-petB-petD*) auf Präzipitate nach einer cpRNP-IP könnten zeigen, ob Vorläufer-RNAs im Vergleich zu reifen mRNAs vermehrt mit dem cpRNP kopräzipitieren. Dabei sollten die Immunpräzipitationen mit Pflanzenextrakten und nicht mit Stroma durchgeführt werden, um eine durch die Isolation der Chloroplasten bedingte Degradierung der RNAs zu verringern (wie dargestellt für *psbA* nach einer CP33B-IP, Abb. 27).

Eine stabilere Bindung von CP33B mit längeren RNAs kann biologisch sinnvoll sein. Auf diese Weise könnte zwischen schon verdauten oder unvollständig transkribierten RNA-Fragmenten und längeren Vorläufer-Transkripten differenziert werden. Letztendlich würde CP33B damit bevorzugt an jüngere, polycistronische und damit vermehrt unprozessierte RNAs binden. Nach dem Ablauf weiterer Reifungsschritte, eventuell innerhalb der cpRNP-

Komplexe/Ribodomänen (s. Kapitel 4.6), würde die Bindestärke gegenüber den reifen Transkripten wieder sinken. Dadurch könnten die Transkripte von der Translationsmaschinerie übernommen werden. Womöglich bevorzugen weitere bzw. alle cpRNPs längere Fragmente. Dies würde die spezifische Reduktion langer Vorläufer-RNAs in den *cp33a*-Mutanten erklären (s. Kap.4.5).

Wodurch könnte eine potentielle Bevorzugung von CP33B gegenüber langen RNA-Fragmenten zustande kommen? Möglicherweise ähnelt sich die Art der RNA-Bindung von CP33B und hnRNP A1, welches phylogenetisch eng mit den cpRNPs verwandt ist (Maruyama et al. 1999). Für hnRNP A1 wurde eine kooperative Bindungsweise festgestellt. So sind hnRNP A1 Proteine nach einer initialen Bindung an einer hochaffinen Bindestelle in der Lage zu multimerisieren. Die neugebundenen hnRNP A1 Moleküle können sich dabei entlang des Transkriptes verteilen (Okunola und Krainer 2009). Es existieren Hinweise, dass auch cpRNPs in Komplexen bzw. als Oligomere vorkommen (mehr dazu s. Kap. 4.6) und dass CP33B über das gesamte Transkript verteilt mit seinen Ziel-mRNAs interagiert (s. Abb. 28). Eventuell ist nur durch eine Kooperation mehrere cpRNP-Moleküle innerhalb eines Transkriptes die RNA-Bindung stabil. Kurze RNAs würden demzufolge durch wenige CP33B-Moleküle gebunden werden, was die Bindestärke herabsetzen würde.

Zudem könnte sich am 3'Ende des ORFs von *psbA* eine hochaffine Bindestelle für CP33B befinden (s. Abb. 28). Ähnlich wie für hnRNP A1 könnte die initiale Bindung von CP33B in dieser Region notwendig sein, damit weitere CP33B Proteine binden. Diese potentielle hochaffine Bindestelle würde nach einer RNA-Fragmentierung innerhalb der meisten kurzen RNA-Fragmente jedoch fehlen und könnte somit ein weiterer Grund für die geringe Kopräzipitation der fragmentierten *psbA* mRNAs mit CP33B sein. Durch eine Wiederholung des Experiments mit einer Oligonukleotid-Sonde aus dem stark angereicherten 3'Ende von *psbA*, könnte diese Hypothese überprüft werden.

4.5 cpRNPs als RNA-Stabilisatoren von Vorläufer-Transkripten

Der Hauptteil aller plastidären Transkripte ist in den *cp33a*-Mutanten gegenüber den Spectinomycin-behandelten Pflanzen reduziert (Abb. 12). Die globale RNA-Reduktion kann durch eine defiziente PEP-Aktivität (s. Kap. 4.1.3) und eine Destabilisierung von Transkripten, wobei vermutlich vor allem Vorläufer-RNAs betroffen sind, erklärt werden. So sind viele Transkripte ≥ 3 knt (Abb. 13 und Abb. 14, *ndhB*, *yef3*, *rpoC1*, *rps2*, *clpP*, *rps8* und *rps15*) in den *cp33a*-Mutanten gegenüber den Spectinomycin-behandelten Pflanzen reduziert.

Dagegen wirkt sich der Verlust von CP33A nicht negativ auf die Stabilität kürzerer oder reifer NEP-Transkripte aus, da diese im Vergleich zu den Spectinomycin-behandelten Pflanzen auf gleichem Niveau oder sogar erhöht sind (Abb. 13 und Abb. 14). Ein weiteres Indiz für die Destabilisierung von Vorläufer-RNAs ist die zwei bis vierfache Reduktion aller ungespleißten Transkripte in *cp33a*-Mutanten gegenüber Spectinomycin-behandelten Pflanzen, wogegen die Reduktion der gespleißten Transkripte viel geringer ist (Abb. 15).

Angriffspunkte für Endonukleasen existieren vor allem in intergenischen Regionen oder Introns (Walter et al. 2010). Somit besitzen Vorläufer-Transkripte mehr RNase-sensitive Stellen als reife Transkripte, wodurch es in den *cp33a*-Mutanten zu einer Destabilisierung der Vorläufer-RNAs kommen kann. Einhergehend mit dieser Hypothese, sind lange, reife mRNAs wie *yef1* und *yef2*, die sehr große kodierende Regionen besitzen, in den *cp33a*-Mutanten gegenüber den Spectinomycin-behandelten Pflanzen nicht reduziert (Abb. 14).

Eine Stabilisierung von ausgewählten mRNAs wurde für einige Mitglieder der cpRNPs aus Tabak, Spinat und Arabidopsis bereits beschrieben, wobei bisher keine Differenzierung von prozessierten und unprozessierten Transkripten untersucht bzw. identifiziert wurde (Nakamura et al. 2001, Lisitsky et al. 1995, Vargas-Suarez et al. 2013, Kupsch et al. 2012).

Da nicht alle Vorläufer-RNAs in den *cp33a*-Mutanten reduziert sind (Ausnahmen sind *accD*, *yef1*, *rrn23*, *rps2* Vorläufer > 6knt,) scheint es entweder sequenzspezifische Unterschiede zwischen den Transkripten zu geben oder es treten Redundanzen in der Stabilisierung mit anderen cpRNPs auf.

Um zu testen, ob noch weitere Vorläufer-Transkripte in den *cp33a*-Mutanten reduziert sind und es sich um ein allgemeines Phänomen für CP33A handelt, wären in Zukunft noch weitere Untersuchungen interessant. Neben Northern-Analysen wäre es dabei ratsam noch andere Experimente, zur Verifizierung der qRT-PCR Daten von CP33A, durchzuführen. So ist die Reduktion einiger mRNAs (*psbA*, *rbcL* und *psbF*) so stark, dass in beiden Albino-Geweben keine Banden mehr detektierbar sind, was einen Vergleich zwischen *cp33a*-Mutanten und Spectinomycin-behandelten Pflanzen unmöglich macht (Abb. 13). Dies betrifft vor allem Transkripte, die durch die PEP abgelesen werden. Durch moderne und globale Sequenzieretechniken könnte überprüft werden, ob reife und/oder unprozessierte Transkripte in den *cp33a*-Pflanzen gegenüber den Spectinomycin-behandelten Pflanzen reduziert sind (Zhelyazkova et al. 2012).

Im Folgenden werden drei mögliche Mechanismen diskutiert, wodurch cpRNPs Transkripte stabilisieren könnten. Erstens: Die RNA-Interaktion der cpRNPs führt zu einer Veränderung der RNA-Struktur, wodurch letztendlich deren Akzessibilität verändert werden kann. Dabei

wird die RNA entweder schlechter zugänglich für Ribonukleasen und/oder besser für andere RNA-Bindeproteine, wie z.B. PPR-Proteine, welche das Fortschreiten von Ribonukleasen verhindern können (Pfalz et al. 2009, Prikryl et al. 2011). Proteine welche die RNA-Struktur verändern können, sind RNA-Chaperone. Für einige cpRNPs, wie CP29C (bzw. PSRP2) aus Arabidopsis und PARBP33 aus Avocado, wurde eine RNA-Chaperon-Aktivität bereits gezeigt (Xu et al. 2013, Daros und Flores 2002). Indem die cpRNPs über das gesamte Transkript verteilt binden (s. Kap. 4.3.2), können größere Abschnitte der RNA umstrukturiert werden und dadurch längere Transkriptabschnitte vor Nukleasen geschützt werden.

Zweitens: Womöglich werden mRNAs durch cpRNPs komplett verpackt, ähnlich der Funktionsweise der hnRNPs. Verschiedene hnRNP Proteine bedecken die im Zellkern frisch synthetisierte prä-mRNA und verpacken sie in Partikeln (Chaudhury et al. 2010). Einzelne Mitglieder binden dabei vielfach innerhalb eines Transkriptes. So interagiert das hnRNP A1 Protein im Durchschnitt sechsmal mit einer RNA (Bruun et al. 2016). Die Interaktion der cpRNPs mit multiplen Bindestellen innerhalb einer mRNA könnte ebenfalls zu einer Verpackung in Komplexen führen, in denen Endo- und Exonukleasen letztendlich keine Angriffspunkte mehr finden. Bei den Komplexen könnte es sich um die sogenannte Ribodomänen handeln, auf die im nächsten Kapitel näher eingegangen wird.

Drittens: Die cpRNPs bilden durch ihre RNA-Assoziation selber eine Blockade für das Fortschreiten von Ribonukleasen bzw. fördern die Bindung von weiteren RNA-Bindeproteinen durch direkte Protein-Protein-Interaktionen. Es existieren bisher keinerlei Daten die belegen, dass cpRNPs die Bindung von anderen Proteinen blockieren und nur wenige Daten von RRM-tragenden Proteinen. So verhindert das mit drei RRM-Domänen ausgestattete hnRNP F aus Säugetierzellen die Bindung von CstF-64 (*cleavage stimulatory factor 64 kDa subunit*) und dessen RNA-Spaltungsreaktion an seiner Ziel-Sequenz (Veraldi et al. 2001). Nach dem Bindemodell der RRM-Domäne aus hnRNP C erfolgt die RNA-Interaktion mit der Oberfläche des β -Faltblattes. Als Konsequenz ist die RNA nicht in einer Bindetasche des Proteins vergraben, sondern bleibt weiterhin zugänglich für die Bindung anderer RNA-Bindeproteine (Dreyfuss et al. 1993). Daher scheint es wahrscheinlicher, dass die RNA-Assoziation von Proteinen mit RRM-Domänen, wie den cpRNPs, eher die Bindung von anderen Proteinen fördert als zu blockieren. Es gibt einzelne Beweise für eine kooperative Bindung von RRM-tragenden Proteinen mit anderen RNA-Bindeproteinen (Hennig et al. 2014, Kuwasako et al. 2014), aber bisher noch keine für cpRNPs.

4.6 Ribodomänen – hochmolekulare Komplexe definiert durch cpRNPs?

CP33A Proteine akkumulieren im Stroma zu punktförmigen Aggregaten (Teubner et al. 2017). Diese CP33A-Zentren sind vermutlich reich an mRNA. So interagiert CP33A mit dem Hauptteil aller plastidären mRNAs und bindet über 50% der im Stroma befindlichen *rbcL* und *psbF* Transkripte (Abb. 7). Doch bei den CP33A-Aggregaten handelt es sich nicht um Nukleoide, wie eine fehlende Ko-Lokalisation mit PEND in den Fluoreszenzmikroskopie-Studien (s. Kapitel 3.1.1) belegt. Vermutlich sind es auch keine Orte der Translation (Uniacke und Zerges 2007), da CP33A nicht mit rRNAs, tRNAs und Polysomen assoziiert (Abb. 7 und Abb. 9). Aus diesem Grund haben wir für die CP33A-Zentren einen neuen Begriff vorgeschlagen, Ribodomänen (Teubner et al. 2017).

Bereits in Tabak wurde dargestellt, dass cpRNPs zu Komplexen aggregieren können. Dabei konnten in Größenausschluss-Chromatographie-Experimenten auf Stroma-Fractionen, mit anschließendem Immunoblot, RNase-empfindliche Komplexe mit einer Größe von über 600kDa identifiziert werden (Nakamura et al. 2001). Zusätzlich wurden in Arabidopsis analoge Experimente zur Identifizierung großer Megadalton-Komplexe durchgeführt. Durch anschließende Massenspektroskopie wurden CP33B sowie zwei weitere Vertreter der cpRNPs (CP29B und CP28B) in Komplexen von 0,8 bis 2MDa in den Stroma-Fractionen nachgewiesen (Olinares et al. 2010). Analysen mit einem Dichtegradienten innerhalb dieser Studie deuten ebenfalls auf eine Lokalisation von CP33A in hochmolekularen Komplexen von bis zu 2,5MDa hin (Abb. 9). Bei den Komplexen handelt es sich jedoch sehr wahrscheinlich nicht um die erwähnten Ribodomänen. Auf den Fluoreszenzmikroskopie-Bildern erscheinen die Ribodomänen im Durchmesser ungefähr genauso groß, wenn nicht größer, als die durch PEND-dsRed dargestellten Nukleoide (Teubner et al. 2017). Nukleoide laufen im Gradienten noch vor Polysomen und haben ein Molekulargewicht von ~5 MDa (Olinares et al. 2010). Vermutlich kommt es während der experimentellen Prozedur zur Dissoziation der Ribodomänen, was nicht ungewöhnlich für große Partikel wie z.B. Stress-Granules ist (Wheeler et al. 2017), welche den Ribodomänen ähneln (s. dazu nächstes Kap.).

Womöglich ist auch CP33B Teil der Ribodomänen bzw. bildet eigene RNA-Zentren. So wird für CP33B neben einer hauptsächlich diffusen Verteilung auf den Fluoreszenzmikroskopie-Bildern auch vereinzelte Konzentrierungen beobachtet (Abb. 5). Auch andere Mitglieder der cpRNP-Familie könnten beteiligt sein, so überlappen die Signale von CP33A-GFP und CP31A-dsRed zum Teil in Kolokalisationsstudien (Teubner et al. 2017). In weiteren analogen Studien kolokalisiert CP28A mit CP33A, CP33B und anderen cpRNPs. Dabei wurde eine

direkte Interaktion von CP28A mit CP31B in *yeast two hybrid* Analysen gezeigt (unveröffentlichte Daten, AG Kirsten Krause und Doktorarbeit Janina Fuss 2012).

Die Ribodomänen könnten eine plastidäre Variante der hnRNP-Komplexe darstellen. So aggregieren hnRNP-Proteine typischerweise mit vielen weiteren Proteinen zu Komplexen (Dreyfuss et al. 2002, Krecici und Swanson 1999), welche mit einem Sedimentationskoeffizient von bis zu 200S sehr groß sein können (Samarina et al. 1968). In den hnRNP-Komplexen kommt es je nach Bedarf für spezifische Prozesse zur Assoziation und Dissoziation von bestimmten Proteinen (Dreyfuss et al. 2002). Ähnlich könnte auch die Zusammensetzung der plastidären Ribodomänen dynamisch sein und sich je nach Entwicklungsstadium der Pflanze bzw. abhängig von bestimmten Umweltbedingungen verändern. In *Arabidopsis* existieren Hinweise, dass sich CP29A nach Kälteeinwirkung vermehrt in punktförmigen Aggregaten in der Peripherie der Chloroplasten anordnet (persönliche Mitteilung Stephanie Gathmann).

Die genaue Zusammensetzung der Ribodomänen und wie es zu ihrer Bildung kommt, bleibt Gegenstand zukünftiger Forschungen. Dabei sollte auch geklärt werden ob der Zusammenschluss eher über Protein-Protein oder über Protein-RNA-Protein Interaktionen erfolgt. Zumindest in Tabak zerfielen die 600kDa Komplexe nach RNase Behandlung (Nakamura et al. 2001). Auf den möglichen Nutzen einer Aggregation der cpRNPs in großen Komplexen wird im nächsten Kapitel eingegangen.

4.6.1 Ribodomänen und ihre Funktion im Schutz von Polysomen dissoziierten mRNAs

Viele RNA-Reifungsprozesse laufen im Chloroplast kotranskriptional ab. So wird ein erheblicher Anteil an Prozessierungsfaktoren im Nukleoid und prozessierte RNAs in TAC-Fraktionen (*transcriptional active Chromosomes*) identifiziert (Majeran et al. 2012, Lehniger et al. 2017). Für posttranskriptionelle Modifikationen, die außerhalb der Nukleoide stattfinden, kann eine Lokalisation in Subkompartimenten, wie z.B. den Ribodomänen, sinnvoll sein. So könnten auch andere RNA-Bindeproteine innerhalb der Ribodomänen mit den, von den cpRNPs gebundenen, mRNAs interagieren, wodurch Reaktionsräume für die Reifung dieser mRNAs entstehen. Gleichzeitig wären die unreifen RNAs vor einer frühzeitigen Interaktion mit dem Translationsapparat bewahrt und zusätzlich durch die Bindung der cpRNPs, vor Angriffen von Endo- und Exonukleasen geschützt. Übereinstimmend mit dieser These wird in dieser Studie gezeigt, dass CP33A vor allem Vorläufer-mRNAs vor ihrem Abbau schützt (mehr dazu Kapitel 4.5).

Abgesehen davon könnten Ribodomänen eine Art Puffer für mRNAs darstellen. So sind Pflanzen u.a. plötzlichen Lichtveränderungen ausgesetzt, wodurch eine schnelle Anpassung der Photosynthese und damit einhergehend der plastidären Proteinsynthese nötig wird. Die Ribodomänen könnten bei einer Reduktion der Translationsrate, die von den Polysomen freigesetzten mRNAs abfangen und im Fall einer Translations-Steigerung dem Translationsapparat wieder zur Verfügung stellen. Ko-Immunopräzipitationen von CP33A aus Pflanzenextrakten nach einer Behandlung mit Puromycin deuten darauf hin, dass CP33A an von Ribosomen befreite mRNAs bindet (**Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**). Puromycin verursacht die Dissoziation der Ribosomen während der Elongation der Translation und betrifft damit nur aktive Polysomen (Azzam und Algranati 1973). Damit könnte CP33A von Polysomen dissoziierte Transkripte beschützen, bis deren Translation wieder fortgesetzt werden kann. *In vivo* tritt solch eine Situation täglich während des Tag/Nacht-Wechsels auf. So sind während der Dunkelphase weniger Transkripte mit Polysomen beladen als bei Lichteinwirkung (Klein et al. 1988). Ebenfalls führen verschiedene Stressbedingungen wie Lichtstress, Hitze und Trockenstress zur Ablösung der mRNAs von den Ribosomen (McKim und Durnford 2006, Yangüez et al. 2013, Hsiao 1970, Kawaguchi et al. 2004).

Außerhalb der Chloroplasten führt die Dissoziation der cytoplasmatischen Polysomen zur Bildung von zwei Arten von RNA-Granules, Stress Granules und *Processing bodies*. Bei beiden handelt es sich um körnchenartige Strukturen, die mit dem Mikroskop in der Zelle erkennbar sind. Die freigesetzten mRNAs werden entweder aufbewahrt (Stress Granules) oder abgebaut (*Processing bodies*) (Anderson und Kedersha 2009, Thomas et al. 2011). Auch hnRNPs sind häufig Bestandteil von RNA-Granules (Kosturko et al. 2006, Anderson und Kedersha 2009). Möglicherweise stellen Ribodomänen eine Form von RNA-Granules in Chloroplasten dar. Bisher existieren nur wenige Hinweise auf RNA-Granules in Organellen. So wurde eine Form von Stress-Granules in Chloroplasten von *Chlamydomonas* und eine neue Form von RNA-Granules in Mitochondrien von HeLa-Zellen nachgewiesen (Uniacke und Zerges 2008, zusammengefasst in Jourdain et al. 2016).

In dieser Arbeit wurden CP33A-RIP-Chip-Analysen mit Stroma- und mit Gesamtpflanzenextrakten durchgeführt (Abb. 7 und Abb. 16). Bei einem Vergleich beider Analysen erscheint insgesamt weniger RNA bei einer Verwendung von Gesamtpflanzenmaterial mit CP33A zu kopräzipitieren, als wenn Stroma verwendet wird. Die beiden Methoden unterscheiden sich vor allem im zeitlichen Aufwand des experimentellen Ablaufs. Dadurch entstand die Hypothese, dass es während der mehrstündigen Stroma-

Präparation, womöglich zur vermehrten Dissoziation von Polysomen kommt, wodurch mehr Transkripte von CP33A gebunden werden können. Angenommen dies ist tatsächlich der Fall, dann spiegeln die hohen Kopräzipitations-Werte einzelner mRNAs (wie 50 % *rbcL* und *psbF* während der CP33A-IP und 90% *psbA* während der CP33B-IP) möglicherweise Verhältnisse unter Stressbedingungen dar. Quantitative Analysen mit Gesamtpflanzenextrakten, wie z.B. *Dot-Blot*-Experimente, welche die RIP-Chip-Daten bestätigen, stehen allerdings noch aus. Des Weiteren kann noch nicht ausgeschlossen werden, dass die geringere RNA-Präzipitation in den RIP-Chip-Experimenten mit lysiertem Pflanzenmaterial durch eine ineffizientere Immunopräzipitation von CP33A zu Stande kommt.

Weitere RIP-Chip-Experimente auf Pflanzenextrakte vor und nach verschiedenen Stressbedingungen und während der Dunkelheit könnten klären, ob CP33A auch *in vivo* eine Funktion in der Assoziation mit freigesetzten mRNAs übernimmt. Zusätzlich könnten erneute Fluoreszenzmikroskopie-Studien von CP33A, unter den erwähnten stressauslösenden Bedingungen und Kotransfektionen mit weiteren RNA-Prozessierungsfaktoren, die außerhalb des Nukleoids lokalisieren, Hinweise über die Bildung und Zusammensetzung der Ribodomänen geben.

4.7 Modell der Funktionsweise von CP33A

Die bisher gewonnenen Erkenntnisse und Hypothesen über die Funktionsweise von CP33A werden nun in einem Modell dargestellt.

In reifen Chloroplasten sind zwei verschiedene Typen von RNA-Polymerasen (PEP- und NEP-Polymerasen) aktiv und transkribieren gemeinsam das gesamte plastidäre Transkriptom. Dabei werden photosynthetische Gene vor allem durch die PEP (Abb. 30, Transkripte dargestellt in grün) und Haushaltsgene, wie Gene für ribosomale Proteine und für die PEP selber, durch die NEP (Abb. 30, Transkripte in rot) abgelesen (Hajdukiewicz et al 1997).

In den *cp33a*-Mutanten scheint es zu einer Störung der PEP-Aktivität zu kommen, wodurch letztendlich die NEP-Aktivität gesteigert wird. Eine mögliche Stabilisierung von vorzugsweise langen Vorläufer-Transkripten durch CP33A, führt in den *cp33a*-Mutanten jedoch zu einem Ausbleiben des typischen Anstiegs vieler NEP-Transkripte.

Der PEP-Defekt wird eventuell durch eine Beteiligung von CP33A an der posttranskriptionellen Prozessierung der *rpo*-mRNAs oder der mRNAs für ribosomale Proteine verursacht. Somit wird die PEP-Aktivität in den *cp33a*-Mutanten entweder durch eine defekte Genexpression seiner Untereinheiten gestört und/oder indirekt durch einen globalen Defekt der plastidären Translation.

Zudem bindet CP33A seine Zieltranskripte wahrscheinlich ähnlich wie andere cpRNPs an multiplen Bindestellen, wodurch seine Aggregation in Komplexen gefördert werden und dadurch wiederum eine Präferenz für lange Vorläufer-Transkripte entstehen könnte.

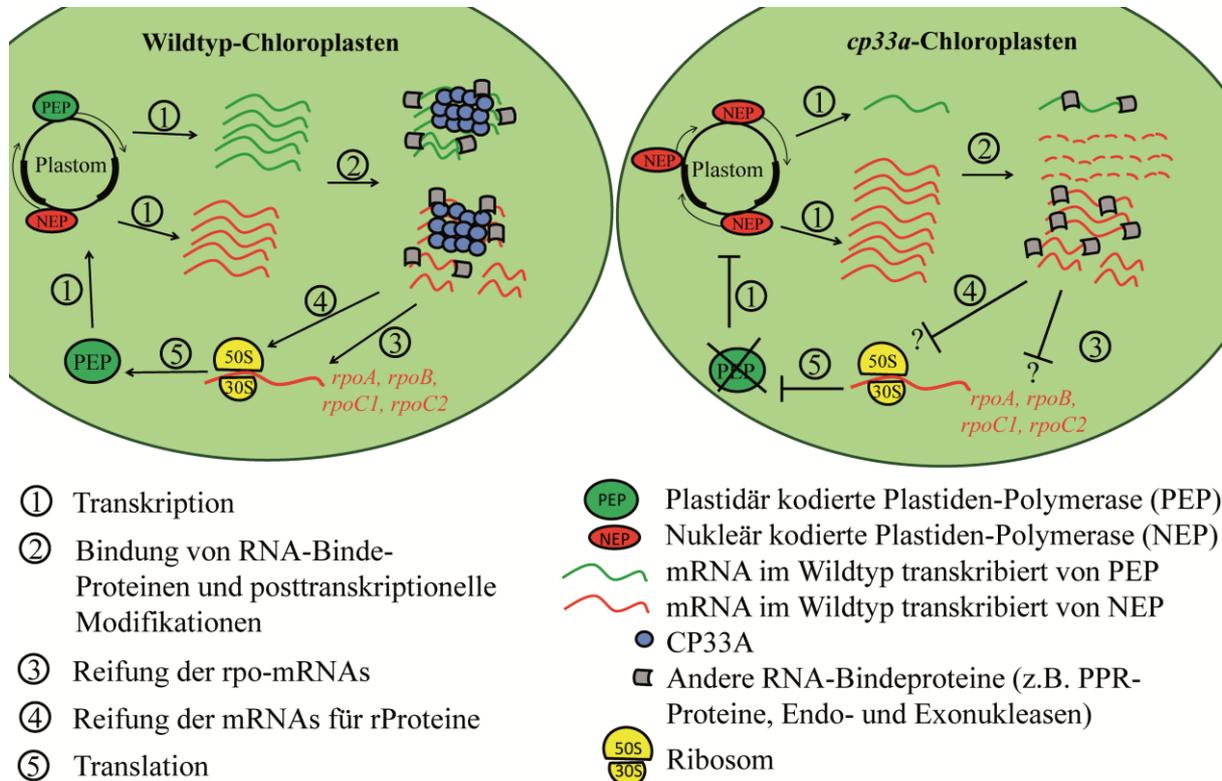


Abb. 30: Modell der Funktionsweise von CP33A

In den *cp33a*-Mutanten ist die PEP nicht mehr aktiv, dadurch steigt die NEP-Aktivität und es kommt zu einer erhöhten Transkription von typischen NEP-transkribierten RNAs. Transkripte die im Wildtyp von der PEP abgelesen werden, werden in den *cp33a*-Mutanten in einem geringen Maße von der NEP übernommen, in dem andere Promotoren verwendet werden. Der Verlust von CP33A führt zu einer Reduktion vieler langer Vorläufer-RNAs. Womöglich sind während der RNA-Bindung mehrere CP33A-Moleküle zu einem Komplex aggregiert. CP33A könnte einen Einfluss auf posttranskriptionelle Prozesse der rpo-mRNAs (*rpoA*, *rpoB*, *rpoC1* und/oder *rpoC2*) (3) und/oder der mRNAs ribosomaler Proteine (rProteine (4)) ausüben. Dadurch könnte nach dem Verlust von CP33A die PEP-Aktivität entweder direkt (3) oder indirekt (4) über eine verminderte Translation gehemmt sein. Viele weitere RNA-Bindeproteine sind an posttranskriptionellen Modifikationen beteiligt und hier nur vereinfacht dargestellt.

Literaturverzeichnis

- Allison, L. A., Simon, L. D. und Maliga, P.** (1996). Deletion of *rpoB* reveals a second distinct transcription system in plastids of higher plants. *The EMBO Journal*, **15**, 2802-9.
- Anderson, P. und Kedersha, N.** (2009). RNA granules: Post-transcriptional and epigenetic modulators of gene expression. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **10**, 430–436.
- Andriankaja, M., Dhondt, S., De Bodt, S., Vanhaeren, H., Coppens, F., De Milde, L., Mühlenbock, P., Skirycz, A., Gonzalez, N., Beemster, G.T. und Inzé, D.** (2012). Exit from proliferation during leaf development in *Arabidopsis thaliana*: a not-so-gradual process. *Developmental Cell*, **22**, 64–78.
- Apuya, N.R., Yadegari, R., Fischer, R.L., Harada, J.J., Zimmerman, J.L. und Goldberg, R.B.** (2001). The *Arabidopsis* embryo mutant *schlepperless* has a defect in the *chaperonin-60* alpha gene. *Plant Physiology*; **126**, 717–730.
- Aryamanesh, N., Ruwe, H., Sanglard, L. V. P., Eshraghi, L., Bussell, J. D., Howell, K. A., Small, I. und Colas des Francs-Smal, C.** (2017). The pentatricopeptide repeat protein EMB2654 is essential for trans-splicing of a chloroplast small ribosomal subunit transcript. *Plant Physiology*, **173**, 1164–1176.
- Asakura, Y. und Barkan, A.** (2006). *Arabidopsis* orthologs of maize chloroplast splicing factors promote splicing of orthologous and species-specific group II introns. *Plant Physiology*, **142**, 1656-1663.
- Azzam, M.E. und Algranati, I.D.** (1973). Mechanism of Puromycin Action: Fate of Ribosomes after Release of Nascent Protein Chains from Polysomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **70**, 3866–3869.
- Bandziulis, R.J., Swanson, M.S. und Dreyfuss, G.** (1989). RNA-binding proteins as developmental regulators. *Genes and Development*, **3**, 431–437.
- Barkan, A.** (1989). Tissue-dependent plastid RNA splicing in maize: transcripts from four plastid genes are predominantly unspliced in leaf meristems and roots. *The Plant cell*, **1**, 437-445.
- Barkan, A.** (1993). Nuclear mutants of maize with defects in chloroplast polysome assembly have altered chloroplast RNA metabolism. *The Plant Cell*, **5**, 389–402.
- Barkan, A.** (2011). Expression of plastid genes: organelle-specific elaborations on a prokaryotic scaffold. *Plant physiology*, **155**, 1520-1532.
- Barkan, A., Rojas, M., Fujii, S., Yap, A., Chong, Y.S., Bond, C.S. und Small, I.** (2012). A combinatorial amino acid code for RNA recognition by pentatricopeptide repeat proteins. *PLoS genetics*, **8**, e1002910.
- Barkan, A. und Small, I.** (2014). Pentatricopeptide repeat proteins in plants. *Annual Review of Plant Biology*, **65**, 415–442.

- Bayer-Császár, E., Haag, S., Jörg, A., Glass, F., Härtel, B., Obata, T., Meyer, E.H., Brennicke, A., und Takenaka, M.** (2017). The conserved domain in MORF proteins has distinct affinities to the PPR and E elements in PPR RNA editing factors. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1860**, 813–828.
- 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. *Molecular and Cellular Biology*, **28**, 5337-5347.
- Belostotsky, D. A.** (2003). Unexpected Complexity of Poly(A)-Binding Protein Gene Families in Flowering Plants: Three Conserved Lineages That Are at Least 200 Million Years Old and Possible Auto- and Cross-Regulation. *Genetics*, **163**, 311–319.
- Ben-Aziz, A. und Koren, E.** (1974). Interference in Carotenogenesis as a Mechanism of Action of the Pyridazinone Herbicide Sandoz 6706: Accumulation of C-40 Carotenoid Precursors Inhibition of β -Carotene Synthesis and Enhancement of Phytoene Epoxidation. *Plant Physiology*, **54**, 916–920.
- Bertani, G.** (1951). Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*, *Journal of Bacteriology*, **62**, 293-300.
- Bohne A.V., Weihe A. und Börner T.**(2009). Transfer RNAs inhibit *Arabidopsis* phage-type RNA polymerases, *Endocytobiosis and Cell Research*, **19**, 63–69.
- Börner, T., Aleynikova, A.Y., Zubo, Y.O., und Kusnetsov, V.V.** (2015). Chloroplast RNA polymerases: Role in chloroplast biogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1847**, 761-769.
- Boussardon, C., Avon, A., Kindgren, P., Bond, C.S., Challenor, M., Lurin, C. und Small, I.** (2014). The cytidine deaminase signature HxE(x)_nCxxC of DYW1 binds zinc and is necessary for RNA editing of *ndhD-1*. *New Phytologist*, **203**, 1090–1095.
- Boussardon, C., Salone, V., Avon, A., Berthome, R., Hammani, K., Okuda, K., Shikanai T., Small I. und Lurin, C.** (2012). Two interacting proteins are necessary for the editing of the NdhD-1 site in *Arabidopsis* plastids. *The Plant cell*, **24**, 3684-3694.
- Boyle, B. und Brisson, N.** (2001). Repression of the defense gene PR-10a by the single-stranded DNA binding protein SEBF. *Plant Cell*, **13**, 2525–37.
- Bruun, G.H., Doktor, T.K., Borch-Jensen, J., Masuda, A., Krainer, A.R., Ohno, K. und Andresen, B.S.** (2016). Global identification of hnRNP A1 binding sites for SSO-based splicing modulation. *BMC Biology*, **14**, 54.
- Bryant, N., Lloyd, J., Sweeney, C., Myouga, F. und Meinke D.** (2011). Identification of nuclear genes encoding chloroplast-localized proteins required for embryo development in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **155**, 1678–1689.
- Chateigner-Boutin, A. L., Ramos-Vega, M., Guevara-Garcia, A., Andres, C., de la Luz Gutierrez-Nava, M., Cantero, A., Delannoy, E., Jimenez, L. F., Lurin, C., Small, I. D. und Leon, P.** (2008). CLB19, a pentatricopeptide repeat protein required for editing of *rpoA* and *clpP* chloroplast transcripts. *Plant Journal*, **56**, 590-602.
- Chaudhury, A., Chander, P. und Howe, P.H.** (2010). Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (hnRNPs) in cellular processes: Focus on hnRNP E1's multifunctional regulatory roles. *RNA*, **16**, 1449–62.

- Cheng, S.H., Cline, K. und DeLisle, A.J.** (1994). An *Arabidopsis* chloroplast RNA binding protein gene encodes multiple mRNAs with different 5' ends. *Plant physiology*, **106**, 303–11.
- Chitnis, P.R.** (1996). Photosystem I. *Plant Physiology*, **111**, 661–669.
- Choquet, Y. und Wollman, F.A.** (2009). The CES process. Harris E.H., Stern D. und Witman G.B. (eds) *The Chlamydomonas Sourcebook*, Elsevier, Amsterdam, 1027-1063.
- Churin, Y., Hess, W. R. und Börner, T.** (1999). Cloning and characterization of three cDNAs encoding chloroplast RNA-binding proteins from barley (*Hordeum vulgare* L.): differential regulation of expression by light and plastid development. *Current Genetics*, **36**, 173-81.
- Cléry, A. und Allain F. H.-T.** (2011). From Structure To Function Of RNA Binding Domains. *Madame Curie Bioscience Database*, 2000-2013.
- Cook, W. B. und Walker, J. C.** (1992). Identification of a maize nucleic acid-binding protein (NBP) belonging to a family of nuclear-encoded chloroplast proteins. *Nucleic Acids Research*, **20**, 359-364.
- Daròs, J.-A. und Flores, R.** (2002). A chloroplast protein binds a viroid RNA *in vivo* and facilitates its hammerhead-mediated self-cleavage. *The EMBO Journal*, **21**, 749-759.
- Dauvillée, D., Stampacchia, O., Girard-Bascou, J. und Rochaix, J.-D.** (2003). Tab2 is a novel conserved RNA binding protein required for translation of the chloroplast *psaB* mRNA. *The EMBO Journal*, **22**, 6378–6388.
- De Longevialle, A. F., Hendrickson, L., Taylor, N. L., Delannoy, E., Lurin, C., Badger, M., Millar, A. H. und Small, I. D.** (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 Journal*, **56**, 157-168.
- De Longevialle, A.F., Small, I.D. und Lurin, C.** (2010). Nuclearly Encoded Splicing Factors Implicated in RNA Splicing in Higher Plant Organelles. *Molecular plant*, **3**, 691-705.
- Deng, X. W. und Gruissem, W.** (1987). Control of plastid gene expression during development: the limited role of transcriptional regulation. *Cell*, **49**, 379-87.
- Desai, U. J. und Pfaffle, P. K.** (1995). Single-step purification of a thermostable DNA polymerase expressed in *Escherichia coli*. *BioTechniques*, **19**, 780-784.
- De Santis-Maciossek, G., Kofer, W., Bock, A., Schoch, S., Maier, R. M., Wanner, G., Rüdiger, W., Koop, H.-U. und Herrmann R. G.** (1999). Targeted disruption of the plastid RNA polymerase genes *rpoA*, *B* and *Cl*: molecular biology, biochemistry and ultrastructure. *Plant Journal*, **18**, 477–489.
- 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**, Seite 37-48.
- Drescher, A., Ruf, S., Calsa, T. Jr, Carrer, H. und Bock, R.** (2000). The two largest chloroplast genome-encoded open reading frames of higher plants are essential genes. *Plant Journal*, **22**, 97–104.
- Dreyfuss, G., Matunis, M. J., Pinol-Roma, S. und Burd, C. G.** (1993). hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA. *Annual Review of Genetics*, **62**, 289-321.

- Dreyfuss, G., Kim, V.N. und Kataoka, N.** (2002). Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **3**, 195–205.
- Eckhardt, U., Grimm, B. und Hortensteiner, S.** (2004). Recent advances in chlorophyll biosynthesis and breakdown in higher plants. *Plant Molecular Biology*, **56**, 1-14.
- Edwards, K., Johnstone, C. und Thompson, C.** (1991). A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Research*, **19**, 1349.
- Eichacker, L.A., Helfrich, M., Rüdiger, W., und Müller, B.** (1996). Stabilization of chlorophyll a-binding apoproteins P700, CP47, CP43, D2, and D1 by chlorophyll a or Zn-pheophytin a. *The Journal of Biological Chemistry*, **271**, 32174-32179.
- Emanuel, C., Weihe, A., Graner, A., Hess, W.R. und Borner, T.** (2004). Chloroplast development affects expression of phage-type RNA polymerases in barley leaves. *Plant Journal*, **38**, 460–472.
- Felder, S., Meierhoff, K., Sane, A.P., Meurer, J., Driemel, C., Plucken, H., Klaff, P., Stein, B. Bechtold, N. und Westhoff, P.** (2001). The nucleus-encoded HCF107 gene of *Arabidopsis* provides a link between intergenic RNA processing and the accumulation of translation-competent psbH transcripts in chloroplasts. *The Plant cell*, **13**, 2127-2141.
- Ferro, M., Brugière, S., Salvi, D., Seigneurin-Berny, D., Court, M., Moyet, L., Ramus, C., Miras, S., Mellal, M., Le Gall, S. et al.** (2010). AT_CHLORO, a comprehensive chloroplast proteome database with subplastidial localization and curated information on envelope proteins. *Molecular Cell Proteomics*, **9**, 1063–1084.
- Friso, G., Giacomelli, L., Ytterberg, A., Peltier, J., Rudella, A., Sun, Q. und van Wijk, K.** (2004). In Depth Analysis of the Thylakoid Membrane Proteome of *Arabidopsis thaliana* Chloroplasts: New Proteins, New Functions, and a Plastid Proteome Database. *The Plant Cell Online*, **16**, 478–499.
- Fleischmann, T.T., Scharff, L.B., Alkatib, S., Hasdorf, S., Schöttler, M.A. und Bock, R.** (2011). Nonessential plastid-encoded ribosomal proteins in tobacco: a developmental role for plastid translation and implications for reductive genome evolution. *Plant Cell*, **23**, 3137–3155.
- Fu, Z.Q., Guo, M., Jeong, B.R., Tian, F., Elthon, T.E., Cerny, R.L., Staiger, D. und Alfano, J.R.** (2007). A type III effector ADP-ribosylates RNA-binding proteins and quells plant immunity. *Nature*, **447**, 284–288.
- Fuss, J., Liegmann, O., Krause, K. und Rensing, S.A.** (2013). Green targeting predictor and ambiguous targeting predictor 2: the pitfalls of plant protein targeting prediction and of transient protein expression in heterologous systems. *New Phytologist*, **200**, 1022–1033.
- Germain, A., Hotto, A.M., Barkan, A. und Stern, D.B.** (2013). RNA processing and decay in plastids. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA*, **4**, 295-316.
- Germain, A., Kim, S.H., Gutierrez, R. und Stern, D.B.** (2012). Ribonuclease II preserves chloroplast RNA homeostasis by increasing mRNA decay rates, and cooperates with polynucleotide phosphorylase in 3' end maturation. *The Plant journal*, **72**, 960-971.

- Gonzalez-Lamothe, R., Boyle, P., Dulude, A., Roy, V., Lezin-Doumbou, C., Kaur, G.S., Bouarab, K., Despres, C. und Brisson, N.** (2008). The transcriptional activator Pti4 is required for the recruitment of a repressosome nucleated by repressor SEBF at the potato PR-10a gene. *Plant Cell*, **20**, 3136–47.
- Gosai, S. J., Foley, S. W., Wang, D., Silverman, I. M., Selamoglu, N., Nelson, A. D., Beilstein, M.A., Daldal, F., Deal, R.B. und Gregory, B.D.** (2015). Global analysis of the RNA-protein interaction and RNA secondary structure landscapes of the *Arabidopsis* nucleus. *Molecular cell*, **57**, 376–388.
- Gray, M. W.** (1999). Evolution of organellar genomes. *Current Opinion in Genetics & Development*, **9**, 678-687.
- Grieco, M., Tikkanen, M., Paakkarinen, V., Kangasjarvi, S. und Aro, E. M.** (2012). Steady-state phosphorylation of light-harvesting complex II proteins preserves photosystem I under fluctuating white light. *Plant Physiology*, **160**, 1896–1910.
- Guillaumot, D., Lopez-Obando, M., Baudry, K., Avon, A., Rigail, G., de Longevialle, F. A., Broche, B., Takenaka, M., Berthomé, R., de Jaeger, G., Delannoy E. und Lurin, C.** (2017). Two interacting PPR proteins are major *Arabidopsis* editing factors in plastid and mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **114**, 8877–8882.
- Hackett, J.B., Shi, X., Kobylarz, A.T., Lucas, M.K., Wessendorf, R.L., Hines, K.M., Bentolila, S., Hanson, M.R. und Lu, Y.** (2017). An organelle RNA recognition motif protein is required for photosynthetic subunit *psbF* transcript editing. *Plant Physiology*, **173**, 2278–2293.
- Hajdukiewicz, P. T., Allison, L. A. und Maliga, P.** (1997). The two RNA polymerases encoded by the nuclear and the plastid compartments transcribe distinct groups of genes in tobacco plastids. *The EMBO Journal*, **16**, 4041-8.
- 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. *The Plant cell*, **21**, 3686-3699.
- Hayes, R., Kudla, J., Schuster, G., Gabay, L., Maliga, P. und Grussem, W.** (1996). Chloroplast mRNA 3'-end processing by a high molecular weight protein complex is regulated by nuclear encoded RNA binding proteins. *The EMBO Journal*, **15**, 1132-41.
- Hennig, J., Militti, C., Popowicz, G.M., Wang, I., Sonntag, M., Geerlof, A., Gabel, F., Gebauer, F. und Sattler, M.** (2014). Structural basis for the assembly of the Sxl-Unr translation regulatory complex. *Nature*, **515**, 287–290.
- Herschlag, D.** (1995). RNA chaperones and the RNA folding problem. *The Journal of Biological Chemistry*, **270**, 20871–20874.
- Hirose, T. und Sugiura, M.** (2001). Involvement of a site-specific trans-acting factor and a common RNA-binding protein in the editing of chloroplast mRNAs: development of a chloroplast *in vitro* RNA editing system. *The EMBO Journal*, **20**, 1144-1152.
- Hogan, D.J., Riordan, D.P., Gerber, A.P., Herschlag, D. und Brown, P.O.** (2008). Diverse RNA-binding proteins interact with functionally related sets of RNAs, suggesting an extensive regulatory system. *PLoS Biology*, **6**, e255.

- Hotto, A. M., Huston Z. E. und Stern D. B.** (2010). Overexpression of a natural chloroplast-encoded antisense RNA in tobacco destabilizes 5S rRNA and retards plant growth. *BMC Plant Biology*, **10**, 213.
- Hricova, A., Quesada, V. und Micol, J.L.** (2006). The SCABRA3 nuclear gene encodes the plastid RpoTp RNA polymerase, which is required for chloroplast biogenesis and mesophyll cell proliferation in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, **141**, 942-956.
- Hsiao, T.C.** (1970). Rapid Changes in Levels of Polyribosomes in *Zea mays* in Response to Water Stress. *Plant Physiology*, **46**, 281-285.
- Ichinose, M., und Sugita, M.** (2016). RNA Editing and Its Molecular Mechanism in Plant Organelles. *Genes (Basel)* **8**.
- Jean-Philippe, J., Paz, S. und Caputi, M.** (2013). hnRNP A1: The Swiss Army Knife of Gene Expression. *International Journal of Molecular Sciences*, **14**, 18999–19024.
- Jourdain, A.A., Boehm, E., Maundrell, K. und Martinou, J.C.** (2016). Mitochondrial RNA granules: Compartmentalizing mitochondrial gene expression. *The Journal of Cell Biology*, **212**, 611–614.
- Kawaguchi, R., Girke, T., Bray, E. A. und Bailey-Serres, J.** (2004). Differential mRNA translation contributes to gene regulation under non-stress and dehydration stress conditions in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, **38**, 823–839.
- Kim, J. und Mullet, J.E.** (1994). Ribosome-binding sites on chloroplast *rbcL* and *psbA* mRNAs and light-induced initiation of D1 translation. *Plant Molecular Biology*, **25**, 437-448.
- Kleffmann, T., von Zychlinski, A., Russenberger, D., Hirsch-Hoffmann, M., Gehrig, P., Gruissem, W. und Baginsky, S.** (2007). Proteome Dynamics during Plastid Differentiation in Rice. *Plant Physiology*, **143**, 912-923.
- Klein, R.R., Mason, H.S. und Mullet, J.E.** (1988). Light-regulated translation of chloroplast proteins. I. Transcripts of *psaA-psaB*, *psbA*, and *rbcL* are associated with polysomes in dark-grown and illuminated barley seedlings. *The Journal of cell biology*, **106**, 289-301.
- Kikuchi, S., Bedard, J., Hirano, M., Hirabayashi, Y., Oishi, M., Imai, Takase, M., Ide, T. und Nakai, M.** (2013). Uncovering the protein translocon at the chloroplast inner envelope membrane. *Science*, **339**, 571-574.
- Kode, V., Mudd, E.A., Iamtham, S. und Day, A.** (2005). The tobacco plastid *accD* gene is essential and is required for leaf development. *Plant Journal*, **44**, 237–244.
- Kosturko, L. D., Maggipinto, M. J., Korza, G., Lee, J. W., Carson, J. H. und Barbarese, E.** (2006). Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein (hnRNP) E1 Binds to hnRNP A2 and Inhibits Translation of A2 Response Element mRNAs. *Molecular Biology of the Cell*, **17**, 3521–3533.
- Krecic, A.M. und Swanson, M.S.** (1999). hnRNP complexes: composition, structure, and function. *Current Opinion in Cell Biology*, **11**, 363–371.
- Kunst, L.** (1998). Preparation of physiologically active chloroplasts from *Arabidopsis*. *Methods in Molecular Biology*, **82**, 43-48.

- Kupsch, C., Ruwe, H., Gusewski, S., Tillich, M., Small, I. und Schmitz-Linneweber, C.** (2012). *Arabidopsis* chloroplast RNA binding proteins CP31A and CP29A associate with large transcript pools and confer cold stress tolerance by influencing multiple chloroplast RNA processing steps. *The Plant cell*, **24**, 4266-4280.
- Kuroda, H. und Maliga, P.** (2003). The plastid *clpP1* protease gene is essential for plant development. *Nature*, **425**, 86–89.
- Kutschera, U. und Niklas, K. J.** (2004). The modern theory of biological evolution: an expanded synthesis. *Naturwissenschaften* **91**, 255-276.
- Kuwasako, K., Takahashi, M., Unzai, S., Tsuda, K., Yoshikawa, S., He, F., et al.** (2014). RBFOX and SUP-12 sandwich a G base to cooperatively regulate tissue-specific splicing. *Nature Structural and Molecular Biology*, **21**, 778–786.
- Kwon, C. und Chung, I.K.** (2004). Interaction of an *Arabidopsis* RNA-binding protein with plant single-stranded telomeric DNA modulates telomerase activity. *Journal of Biological Chemistry*, **279**, 12812–8.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- 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 Journal*, **51**, 751–762.
- Legen, J., Kemp, S., Krause, K., Profanter, B., Herrmann, R.G. und Maier, R.M.** (2002). Comparative analysis of plastid transcription profiles of entire plastid chromosomes from tobacco attributed to wild-type and PEP-deficient transcription machineries. *Plant Journal*, **31**, 171–188.
- Lehniger, M.K., Finster, S., Melonek, J., Oetke, S., Krupinska, K. und Schmitz-Linneweber, C.** (2017). Global RNA association with the transcriptionally active chromosome of chloroplasts. *Plant Molecular Biology*, **95**, 303-311.
- Leister, D.** (2003). Chloroplast research in the genomic age. *Trends in Genetics*, **19**, 47-56.
- Lerbs-Mache, S.** (2011). Function of plastid sigma factors in higher plants: regulation of gene expression or just preservation of constitutive transcription? *Plant molecular biology*, **76**, 235-249
- Li, Y. und Sugiura, M.** (1990). Three distinct ribonucleoproteins from tobacco chloroplasts: each contains a unique amino terminal acidic domain and two ribonucleoprotein consensus motifs. *The EMBO Journal*, **9**, 3059-3066.
- Li, Y. und Sugiura, M.** (1991). Nucleic acid-binding specificities of tobacco chloroplast ribonucleoproteins. *Nucleic Acids Research*, **19**, 2893-2896.
- Liere, K., Weihe, A. und Borner, T.** (2011). The transcription machineries of plant mitochondria and chloroplasts: Composition, function, and regulation. *Journal of plant physiology*, **168**, 1345-1360.
- Link, S., Engelmann, K., Meierhoff, K., und Westhoff, P.** (2012). The atypical short-chain dehydrogenases HCF173 and HCF244 are jointly involved in translational initiation of the *psbA* mRNA of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **160**, 2202-2218.

- Lisitsky, I., Liveanu, V. und Schuster, G.** (1994). RNA-binding activities of the different domains of a spinach chloroplast ribonucleoprotein. *Nucleic Acids Research*, **22**, 4719-4724.
- Lisitsky, I., Liveanu, V. und Schuster, G.** (1995). RNA-Binding Characteristics of a Ribonucleoprotein from Spinach Chloroplast. *Plant Physiology* **107**, 933-941.
- Lisitsky, I. und Schuster, G.** (1995). Phosphorylation of a chloroplast RNA-binding protein changes its affinity to RNA. *Nucleic Acids Research*, **23**, 2506-2511.
- Lohse, M., Drechsel, O., Kahlau, S. und Bock, R.** (2013). OrganellarGenomeDRAW—a suite of tools for generating physical maps of plastid and mitochondrial genomes and visualizing expression data sets. *Nucleic Acids Research*, **41**, W575-W581.
- Loza-Tavera, H., Vargas-Suárez, M., E., D.-M., Torres-Márquez, M. E., González de la Vara, L. E., Moreno-Sánchez, R. und Gruissem, W.** (2006). Phosphorylation of the spinach chloroplast 24 kDa RNA-binding protein (24RNP) increases its binding to *petD* and *psbA* 3' untranslated regions. *Biochimie*, **88**, 1217-1228.
- Maier, R. M. und Schmitz-Linneweber, C.** (2004). Plastid genomes, Daniell, Henry und Chase, Christine D., *Molecular Biology and Biotechnology of Plant Organelles*, 115-150, Springer, Dordrecht.
- Majeran, W., Friso, G., Asakura, Y., Qu, X., Huang, M., Ponnala, L., Watkins, K. P., Barkan, A. und van Wijk, K.J.** (2012). Nucleoid-enriched proteomes in developing plastids and chloroplasts from maize leaves: a new conceptual framework for nucleoid functions. *Plant physiology*, **158**, 156-189.
- Manavski, N., Schmid, L.-M. und Meurer, J.** (2018). RNA-stabilization factors in chloroplasts of vascular plants. *Essays in Biochemistry*, **62**, 51-64.
- 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. XXII, *Yale University Press, New Haven, London*, 349 p.
- Margulies, M. M. und Michaels, A.** (1974). Ribosomes bound to chloroplast membranes in *chlamydomonas reinhardtii*. *The Journal of Cell Biology*, **60**, 65–77.
- Maris, C., Dominguez, C. und Allain, F. H.-T.** (2005). The RNA recognition motif, a plastic RNA-binding platform to regulate post-transcriptional gene expression. *FEBS Journal*, **272**, 2118-2131.
- Maronedze C., Thomas L., Serrano N. L., Lilley K. S. und Gehring C.** (2016). The RNA-binding protein repertoire of *Arabidopsis thaliana*. *Scientific Reports*, **6**, 29766.
- Martin, W. und Herrmann, R.** (1998). Gene transfer from organelles to the nucleus: How much, what happens, and why? *Plant Physiology*, **118**, 9-17.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **99**, 12246-12251.

- Maruyama, K., Sato, N. und Ohta, N.** (1999). Conservation of structure and cold-regulation of RNA-binding proteins in cyanobacteria: probable convergent evolution with eukaryotic glycine-rich RNA-binding proteins. *Nucleic Acids Research*, **27**, 2029-2036.
- McKim, S.M. und Durnford, D.G.** (2006). Translational regulation of light-harvesting complex expression during photoacclimation to high-light in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology and Biochemistry*, **44**, 857–865.
- Mereschkowsky, C.** (1905). Über Natur und Ursprung der Chromatophoren im Pflanzenreich. *Biologisches. Centralblatt*, **25**, 593-604.
- Millen, R.S., Olmstead, R.G., Adams, K.L., Palmer, J.D., Lao, N.T., Heggie, L., Kavanagh, T.A., Hibberd, J.M., Gray, J.C., Morden, C.W., Calie, P.J., Jermin, L.S., und Wolfe, K.H.** (2001). Many parallel losses of *infA* from chloroplast DNA during angiosperm evolution with multiple independent transfers to the nucleus. *Plant Cell*, **13**, 645-658.
- Moazed, D. und Noller, H.F.** (1987). Interaction of antibiotics with functional sites in 16S ribosomal RNA. *Nature*, **327**, 389-394.
- Moschopoulos, A., Derbyshire, P. und Byrne, M. E.** (2012). The *Arabidopsis* organelle-localized glycyl-tRNA synthetase encoded by EMBRYO DEFECTIVE DEVELOPMENT1 is required for organ patterning. *Journal of Experimental Botany*, **63**, 5233–5243.
- Murray, M. G. und Thompson, W. F.** (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, **8**, 4321-4325.
- Nagai, K., Oubridge, C., Jessen, T.H., Li, J. und Evans, P.R.** (1990). Crystal structure of the RNA-binding domain of the U1 small nuclear ribonucleoprotein A. *Nature*, **348**, 515–520.
- Nakagawa, S., Niimura, Y. und Gojobori, T.** (2017). Comparative genomic analysis of translation initiation mechanisms for genes lacking the Shine-Dalgarno sequence in prokaryotes. *Nucleic Acids Research*, **45**, 3922-3931.
- Nakamura, T., Ohta, M., Sugiura, M. und Sugita, M.** (1999). Chloroplast ribonucleoproteins are associated with both mRNAs and intron-containing precursor tRNAs. *FEBS Letters*, **460**, 437-441.
- Nakamura, T., Ohta, M., Sugiura, M. und Sugita, M.** (2001). Chloroplast ribonucleoproteins function as a stabilizing factor of ribosome-free mRNAs in the stroma. *Journal of Biological Chemistry*, **276**, 147-152.
- Nakamura, T., Schuster, G., Sugiura, M. und Sugita, M.** (2004). Chloroplast RNA-binding and pentatricopeptide repeat proteins. *Biochemical Society transactions*, **32**, 571574.
- Nickelsen, J.** (2003). Chloroplast RNA-binding proteins. *Current Genetics*, **43**, 392-399.
- Obayashi, T., Aoki, Y., Tadaka, S., Kagaya, Y. und Kinoshita, K.** (2018). ATTED-II in 2018: A Plant Coexpression Database Based on Investigation of Statistical Property of the Mutual Rank Index. *Plant Cell Physiology*, **59**, e3.
- Ohta, M., Sugita, M. und Sugiura, M.** (1995). Three types of nuclear genes encoding chloroplast RNA-binding proteins (cp29, cp31 and cp33) are present in *Arabidopsis thaliana*: presence of cp31 in chloroplasts and its homologue in nuclei/cytoplasm. *Plant Molecular Biology*, **27**, 529-539.

- Okuda, K., Myouga, F., Motohashi, R., Shinozaki, K. und Shikanai, T.** (2007). Conserved domain structure of pentatricopeptide repeat proteins involved in chloroplast RNA editing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **104**, 8178-8183.
- Okunola, H. L. und Krainer, A. R.** (2009). Cooperative-binding and splicing-repressive properties of hnRNP A1. *Molecular and Cellular Biology*, **29**, 5620–5631.
- Olinares, P.D., Ponnala, L. und van Wijk, K.J.** (2010). Megadalton complexes in the chloroplast stroma of *Arabidopsis thaliana* characterized by size exclusion chromatography, mass spectrometry, and hierarchical clustering. *Molecular and Cellular Proteomics*, **9**, 1594–1615.
- Peled-Zehavi, H., und Danon, A.** (2007). Translation and translational regulation in chloroplasts. In *Cell and Molecular Biology of Plastids*, R. Bock, ed (Berlin: Springer Verlag), pp. 249-281.
- Peeters, N.M., Chapron, A., Giritch, A., Grandjean, O., Lancelin, D., Lhomme, T., Vivrel, A. und Small, I.** (2000). Duplication and quadruplication of *Arabidopsis thaliana* cysteinyl- and asparaginyl-tRNA synthetase genes of organellar origin. *Journal of Molecular Evolution*, **50**, 413–423.
- 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. *The EMBO Journal*, **28**, 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**, 176-197.
- Pontier, D., Albrieux, C., Joyard, J., Lagrange, T. und Block, M.** (2007). Knock-out of the magnesium protoporphyrin IX methyltransferase gene in *Arabidopsis*. Effects on chloroplast development and on chloroplast-to-nucleus signaling. *The Journal of Biological Chemistry*, **282**, 2297–2304.
- Powikrowska, M., Oetke, S., Jensen, P.E. und Krupinska, K.** (2014). Dynamic composition, shaping and organization of plastid nucleoids. *Frontiers in plant science*, **5**, 424.
- Prikryl, J., Rojas, M., Schuster, G. und Barkan, A.** (2011). Mechanism of RNA stabilization and translational activation by a pentatricopeptide repeat protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **108**, 415-420.
- Pyo, Y. J., Kwon, K. C., Kim, A. und Cho, M. H.** (2013). Seedling Lethal1, a pentatricopeptide repeat protein lacking an E/E+ or DYW domain in *Arabidopsis*, is involved in plastid gene expression and early chloroplast development. *Plant Physiology*, **163**, 1844–1858.
- Raab, S., Toth, Z., de Groot, C., Stamminger, T. und Hoth, S.** (2006). ABA-responsive RNA-binding proteins are involved in chloroplast and stromule function in *Arabidopsis* seedlings. *Planta*, **224**, 900–14.
- Rajkowitsch, L., Chen, D., Stampfl, S., Semrad, K., Waldsich, C., Mayer, O., Jantsch, M. F., Konrat, R., Bläsi, U. und Schroeder, R.** (2007). RNA Chaperones, RNA Annealers and RNA Helicases. *RNA Biology*, **4**, 118-130.

- Reiland, S., Messerli, G., Baerenfaller, K., Gerrits, B., Endler, A., Grossmann, J., Gruissem, W. und Baginsky, S.** (2009). Large-Scale *Arabidopsis* Phosphoproteome Profiling Reveals Novel Chloroplast Kinase Substrates and Phosphorylation Networks. *Plant Physiology*, **150**, 889-903.
- Robbins, J. C., Heller, W. P. und Hanson, M. R.** (2009). A comparative genomics approach identifies a PPR-DYW protein that is essential for C-to-U editing of the *Arabidopsis* chloroplast *accD* transcript. *RNA*, **15**, 1142-1153.
- Rogalski, M., Schottler, M. A., Thiele, W., Schulze, W. X. und Bock, R.** (2008). Rpl33, a nonessential plastid-encoded ribosomal protein in tobacco, is required under cold stress conditions. *Plant Cell*, **20**, 2221-37.
- Roy, L.M. und Barkan, A.** (1998). A SecY homologue is required for the elaboration of the chloroplast thylakoid membrane and for normal chloroplast gene expression. *The Journal of cell biology*, **141**, 385-395.
- Rüdinger, M., Volkmar, U., Lenz, H., Groth-Malonek, M. und Knoop, V.** (2012). Nuclear DYW-Type PPR Gene Families Diversify with Increasing RNA Editing Frequencies in Liverwort and Moss Mitochondria. *Journal of Molecular Evolution*, **74**, 37-51.
- Ruwe, H., Kupsch, C., Teubner, M. und Schmitz-Linneweber, C.** (2011). The RNAREcognition motif in chloroplasts. *Journal of Plant Physiology*, **168**, 1361-1371.
- Ruwe, H., Castandet, B., Schmitz-Linneweber, C. und Stern, D.B.** (2013). *Arabidopsis* chloroplast quantitative editotype. *FEBS Letters*, **587**, 1429–1433.
- Salone, V., Rüdinger, M., Polsakiewicz, M., Hoffmann, B., Groth-Malonek, M., Szurek, B., Small, I. D., Knoop, V. und Lurin, C.** (2007). A hypothesis on the identification of the editing enzyme in plant organelles. *FEBS Letters*, **581**, 4132-4138.
- Samarina, O.P., Krichevskaya, A.A. und Georgiev, G.P.** (1966). Nuclear ribonucleoprotein particles containing messenger ribonucleic acid. *Nature*, **210**, 1319–1322.
- Sambrook, J. und Russell, D. W.** (2001). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Scharff L. B. und Bock R.** (2014). Synthetic biology in plastids. *Plant Journal*, **78**, 783–798.
- Scharff, L. B., Childs, L., Walther, D. und Bock, R.** (2011). Local Absence of Secondary Structure Permits Translation of mRNAs that Lack Ribosome-Binding Sites. *PLoS Genetics*, **7**, e1002155.
- Scharff, L.B., Ehrnthaler, M., Janowski, M., Childs, L.H., Hasse, C., Gremmels, J., Ruf, S., Zoschke, R., und Bock, R.** (2017). Shine-Dalgarno Sequences Play an Essential Role in the Translation of Plastid mRNAs in Tobacco. *Plant Cell*, **29**, 3085-3101.
- Scherly, D., Boelens, W., Dathan, N.A., van Venrooij, W.J. und Mattaj, I.W.** (1990). Major determinants of the specificity of interaction between small nuclear ribonucleoproteins U1A and U2B" and their cognate RNAs. *Nature*, **345**, 502–506.
- Schmitz-Linneweber, C. und Barkan, A.** (2007). RNA splicing and RNA editing in chloroplasts, Bock, R., *Cell and Molecular Biology of Plastids*, **19**, 213-248, Springer Verlag, Berlin.

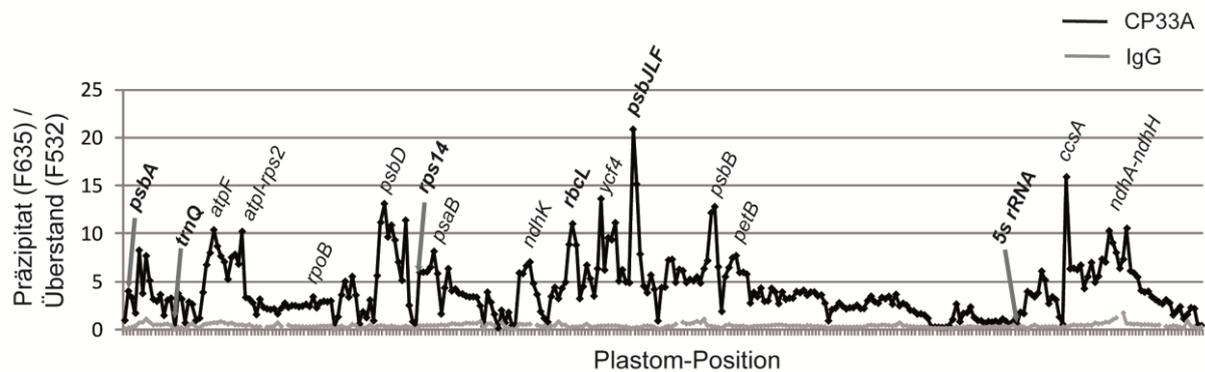
- Schmitz-Linneweber, C., Williams-Carrier, R. und Barkan, A.** (2005). RNA immunoprecipitation and *microarray* analysis show a chloroplast Pentatricopeptide repeat protein to be associated with the 5' region of mRNAs whose translation it activates. *Plant Cell*, **17**, 2791-2804.
- Schmitz-Linneweber, 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**, 2650-2663.
- Schult, K., Meierhoff, K., Paradies, S., Töller, T., Wolff, P., und Westhoff, P.** (2007). The nuclearencoded factor HCF173 is involved in the initiation of translation of the *psbA* mRNA in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, **19**, 1329-1346.
- Schuster, G. und Gruissem, W.** (1991). Chloroplast mRNA 3' end processing requires a nuclear-encoded RNA-binding protein. *The EMBO Journal*, **10**, 1493-502.
- Schwacke, R., Schneider, A., van der Graaff, E., et al.** (2003). ARAMEMNON, a novel database for *Arabidopsis* integral membrane proteins. *Plant Physiology*, **131**, 16–26.
- Sharma, M.R., Wilson, D.N., Datta, P.P., Barat, C., Schluenzen, F., Fucini, P. und Agrawal, R.K.** (2007). Cryo-EM study of the spinach chloroplast ribosome reveals the structural and functional roles of plastid-specific ribosomal proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **104**, 19315–20.
- Shi, X., Hanson, M.R. und Bentolila, S.** (2017). Functional diversity of *Arabidopsis* organelle-localized RNA-recognition motif-containing proteins. *WIREs RNA*, **8**, e1420.
- Shi, C., Wang, S., Xia, E.-H., Jiang, J.-J., Zeng, F.-C., & Gao, L.-Z.** (2016). Full transcription of the chloroplast genome in photosynthetic eukaryotes. *Scientific Reports*, **6**, 30135.
- Shikanai, T.** (2015). RNA editing in plants: Machinery and flexibility of site recognition. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1847**, 779–785.
- Shikanai T., Shimizu K., Ueda K., Nishimura Y., Kuroiwa T. und Hashimoto T.** (2001). The chloroplast *clpP* gene, encoding a proteolytic subunit of ATP-dependent protease, is indispensable for chloroplast development in tobacco. *Plant and Cell Physiology*, **42**, 264–273.
- Sinz, A.** (2014). The advancement of chemical cross-linking and mass spectrometry for structural proteomics: from single proteins to protein interaction networks. *Expert Review of Proteomics*, **11**, 733-43.
- Smith, R.L. und Gordon, J.** (1974). Preparation of avian ribosomes with low levels of contaminating elongation factors. *FEBS Letters*, **43**, 223-6.
- Stern, D. B., Goldschmidt-Clermont, M. und Hanson, M. R.** (2010). Chloroplast RNA metabolism. *Annual Review of Plant Biology*, **61**, 125-155.
- Stern, D. und Gruissem, W.** (1987). Control of Plastid Gene Expression: 3' Inverted Repeats Act as mRNA Processing and Stabilizing Elements, but Do Not Terminate Transcription. *Cell*, **51**, 1145-1157.

- Stoppel, R., Manavski, N., Schein, A., Schuster, G., Teubner, M., Schmitz-Linneweber, C. und Meurer, J.** (2012). RHON1 is a novel ribonucleic acid-binding protein that supports RNase E function in the *Arabidopsis* chloroplast. *Nucleic Acids Research*, **40**, 8593–8606.
- Sugiura, M., Hirose, T., und Sugita, M.** (1998). Evolution and mechanism of translation in chloroplasts. *Annual Review of Genetics*, **32**, 437–459.
- Sun T., Germain A., Giloteaux L., Hammani K., Barkan A., Hanson M.R. und Bentolila S.** (2013). An RNA recognition motif-containing protein is required for plastid RNA editing in *Arabidopsis* and maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **110**, E1169–E1178.
- Sun, T., Bentolila, S. und Hanson, M.** (2016). The unexpected diversity of plant organelle RNA editosomes. *Trends in Plant Science*, **21**, 962–973.
- Takenaka, M.** (2014) How complex are the editosomes in plant organelles? *Molecular plant*, **7**, 582-585.
- Takenaka, M., Zehrmann, A., Brennicke, A. und Graichen, K.** (2013). Improved computational target site prediction for pentatricopeptide repeat RNA editing factors. *PLoS one*, **8**, e65343.
- Terasawa, K. und Sato, N.** (2005). Visualization of plastid nucleoids in situ using the PEND-GFP fusion protein. *Plant Cell Physiology*, **46**, 649–660.
- Teubner, M., Fuß, J., Kühn, K., Krause, K., und Schmitz-Linneweber, C.** (2017). The RNA recognition motif protein CP33A is a global ligand of chloroplast mRNAs and is essential for plastid biogenesis and plant development. *Plant Journal*, **89**, 472-485.
- Theis, J. und Schroda, M.** (2016). Revisiting the photosystem II repair cycle. *Plant Signaling and Behavior*, **11**, e1218587.
- Thomas, M. G., Loschi, M., Desbats, M. A. und Boccaccio, G. L.** (2011). RNA granules: the good, the bad and the ugly. *Cellular Signalling*, **23**, 324–334.
- Tikkanen, M., Nurmi, M., Kangasjarvi, S. und Aro, E.M.** (2008). Core protein phosphorylation facilitates the repair of photodamaged photosystem II at high light. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1777**, 1432-7.
- Tiller, N. und Bock, R.** (2014). The translational apparatus of plastids and its role in plant development. *Molecular Plant*, **7**, 1105–1120.
- Tiller, N., Weingartner, M., Thiele, W., Maximova, E., Schöttler, M.A., und Bock, R.** (2012). The plastid-specific ribosomal proteins of *Arabidopsis thaliana* can be divided into non-essential proteins and genuine ribosomal proteins. *Plant Journal* **69**, 302-316.
- Tillich, M., Beick, S. und Schmitz-Linneweber, C.** (2010). Chloroplast RNA-binding proteins: repair and regulation of chloroplast transcripts. *RNA Biology*, **7**, 172–8.
- Tillich, M., Hardel, S. L., Kupsch, C., Armbruster, U., Delannoy, E., Gualberto, J. M., Lehwerk, P., Leister, D., Small, I. D. und Schmitz-Linneweber, C.** (2009). Chloroplast ribonucleoprotein CP31A is required for editing and stability of specific chloroplast mRNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **106**, 6002-6007.

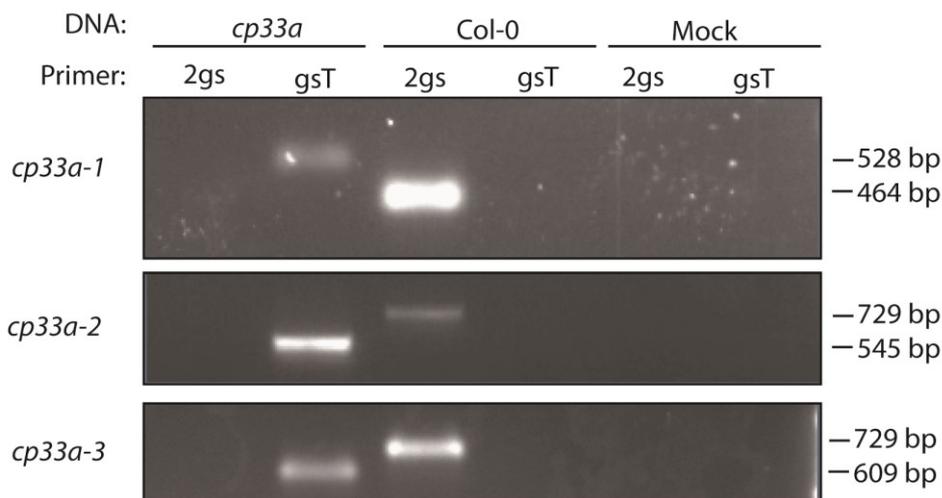
- Timmis, J.N., Ayliffe, M.A., Huang, C.Y. und Martin, W.** (2004). Endosymbiotic gene transfer: organelle genomes forge eukaryotic chromosomes. *National Review of Genetics*, **5**, 123-135.
- Tseng, C.C., Sung, T.Y., Li, Y.C., Hsu, S.J., Lin, C.L. und Hsieh, M.H.** (2010). Editing of *accD* and *ndhF* chloroplast transcripts is partially affected in the *Arabidopsis vanilla cream1* mutant. *Plant Molecular Biology*, **73**; 309–323.
- Uniacke, J. und Zerges, W.** (2007). Photosystem II assembly and repair are differentially localized in *Chlamydomonas*. *Plant Cell*, **19**, 3640–3654.
- Uniacke, J., und W. Zerges.** (2008). Stress induces the assembly of RNA granules in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Journal of Cell Biology*, **182**, 641–646.
- Vargas-Suarez, M., Castro-Sanchez, A., Toledo-Ortiz, G., Gonzalez de la Vara, L. E., Garcia, E. und Loza-Tavera, H.** (2013). Protein phosphorylation regulates *in vitro* spinach chloroplast *petD* mRNA 3'-untranslated region stability, processing, and degradation. *Biochimie*, **95**, 400–409.
- Veraldi, K.L., Arhin, G.K., Martincic, K., Chung-Ganster, L.H., Wilusz, J. und Milcarek, C.** (2001). hnRNP F influences binding of a 64-kilodalton subunit of cleavage stimulation factor to mRNA precursors in mouse B cells. *Molecular and Cellular Biology*, **21**, 1228–1238.
- Wagoner, J.A., Sun, T., Lin, L. und Hanson, M.R.** (2015). Cytidine Deaminase Motifs within the DYW Domain of Two Pentatricopeptide Repeat-containing Proteins Are Required for Site-specific Chloroplast RNA Editing. *The Journal of biological chemistry*, **290**, 2957-2968.
- Walter, M., Piepenburg, K., Schöttler, M.A., Petersen, K., Kahlau, S., Tiller, N., Drechsel, O., Weingartner, M., Kudla, J., und Bock, R.** (2010). Knockout of the plastid RNase E leads to defective RNA processing and chloroplast ribosome deficiency. *Plant Journal*, **64**, 851-863.
- Wang, B.-C., Wang, H.-X., Feng, J.-X., Meng, D.-Z., Qu, L.-J. und Zhu, Y.-X.** (2006). Post-translational modifications, but not transcriptional regulation, of major chloroplast RNA-binding proteins are related to *Arabidopsis* seedling development. *Proteomics*, **6**, 2555-2563.
- Waters, M. und Pyke, K.** (2004). *Plastid Development and Differentiation*. Moller, S.G. (ed.) *Plastids*. Blackwell, Oxford, 30-59.
- Wheeler J. R., Jain S., Khong A., Parker R.** (2017). Isolation of yeast and mammalian stress granule cores. *Methods* **126**, 12–17.
- Williams-Carrier, R., Zoschke, r., Belcher, S., Pfalz, J. und Barkan, A.** (2014). A major role for the plastid-encoded RNA polymerase complex in the expression of plastid transfer RNAs. *Plant Physiology*, **164**, 239–248.
- Wu, H. und Zhang, L. X.** (2010). The PPR protein PDM1 is involved in the processing of *rpoA* pre-mRNA in *Arabidopsis thaliana*. *Chinese Science Bulletin*, **55**, 3485–3489.
- Xu, T., Lee, K., Gu, L., Kim, J.I. und Kang, H.** (2013). Functional characterization of a plastid-specific ribosomal protein PSRP2 in *Arabidopsis thaliana* under abiotic stress conditions. *Plant Physiology and Biochemistry*, **73**, 405–411.

- Yamaguchi, K., und Subramanian, A.R.** (2000). The plastid ribosomal proteins. Identification of all the proteins in the 50 S subunit of an organelle ribosome (chloroplast). *Journal of Biological Chemistry*, **275**, 28466-28482.
- Yamaguchi, K. und Subramanian, A.R.** (2003). Proteomic identification of all plastid-specific ribosomal proteins in higher plant chloroplast 30S ribosomal subunit. *European Journal of Biochemistry*, **270**, 190-205.
- Yamaguchi, K., von Knoblauch, K., und Subramanian, A.R.** (2000). The plastid ribosomal proteins. Identification of all the proteins in the 30 S subunit of an organelle ribosome (chloroplast). *Journal of Biological Chemistry*, **275**, 28455-28465.
- Yan, J., Zhang, Q., und Yin, P.** (2018). RNA editing machinery in plant organelles. *Science China Life Sciences*, **61**, 162–169.
- Yángüez, E., Castro-Sanz, A. B., Fernández-Bautista, N., Oliveros, J. C. und Castellano, M. M.** (2013). Analysis of Genome-Wide Changes in the Translatome of *Arabidopsis* Seedlings Subjected to Heat Stress. *PLoS ONE*, **8**, e71425.
- Ye, L. und Sugiura, M.** (1992). Domains required for nucleic acid binding activities in chloroplast ribonucleoproteins. *Nucleic Acids Research*, **20**, 6275-6279.
- Yin, Q. Q., Cui, Y.L., Zhang, G.R., Zhang, H.D., Wang, X.M. und Yang, Z.N.** (2012). The *Arabidopsis* pentatricopeptide repeat protein PDM1 is associated with the intergenic sequence of S11-*rpoA* for *rpoA* monocistronic RNA cleavage. *Chinese Science Bulletin*, **57**, 3452–3459.
- Zhelyazkova, P., Sharma, C.M., Forstner, K.U., Liere, K., Vogel, J. und Borner, T.** (2012). The primary transcriptome of barley chloroplasts: numerous noncoding RNAs and the dominating role of the plastid-encoded RNA polymerase. *The Plant cell*, **24**, 123-136.
- Zhou, W., Cheng, Y., Yap, A., Chateigner-Boutin, A.-L., Delannoy, E., Hammani, K., Small, I. D. und Huang, J.** (2009). The *Arabidopsis* gene *YS1* encoding a DYW protein is required for editing of *rpoB* transcripts and the rapid development of chloroplasts during early growth. *The Plant Journal*, **58**, 82-96.
- Zimorski, V., Ku, C., Martin, W.F. und Gould, S.B.** (2014). Endosymbiotic theory for organelle origins. *Current opinion in microbiology*, **22C**, 38-48.
- Zoschke, R. und Bock, R.** (2018). Chloroplast Translation: Structural and Functional Organization, Operational Control, and Regulation. *Plant Cell*, **4**, 745-770.
- Zoschke, R., Nakamura, M., Liere, K., Sugiura, M., Borner, T. und Schmitz-Linneweber, C.** (2010). An organellar maturase associates with multiple group II introns. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **107**, 3245-3250.
- Zoschke, R., Watkins, K.P. und Barkan, A.** (2013). A rapid ribosome profiling method elucidates chloroplast ribosome behavior *in vivo*. *Plant Cell*, **25**, 2265-2275.

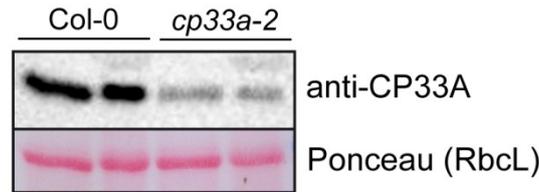
Anhang

**Anhang Abb. 1: CP33A RIP-Chip mit Immunoglobulin als Kontrolle**

Verhältnisse der Fluoreszenzsignale aus koprizipitierter RNA (F635) und ungebundener RNA (F532) aufgetragen gegen die Position auf dem Chloroplastengenom. Als Kontrolle zur CP33A-Immunopräzipitation diente die Immunopräzipitation mit aufgereinigtem Immunoglobulin (IgG). Die Präzipitat/Überstand Verhältnisse (Median (*Median of Ratios*)) wurden auf die Summe der Medianwerte der ribosomalen RNAs der Überstände (Median F532) normalisiert (Daten in Teubner et al. 2017). Gekennzeichnet im Diagramm sind Transkripte mit den höchsten Anreicherungs-werten sowie RNAs (fettgedruckt) die in *Dot-Blot*-Analysen (s. Abb. 7B) untersucht wurden.

**Anhang Abb. 2: Isolation von *cp33a*-Mutanten durch Genotypisierungs-PCRs**

Gesamt-DNA wurde aus Wildtyp-Pflanzen (Columbia-0) und *cp33a*-Mutanten Linien (*cp33a-1*, *cp33a-2* und *cp33a-3*) isoliert und in PCR-Reaktionen eingesetzt. Es wurden pro Reaktion entweder zwei genspezifische Primer (2gs) oder ein genspezifischer und ein T-DNA spezifischer Primer eingesetzt (gsT). Je nach T-DNA-Insertionslinie wurden unterschiedliche genspezifische und T-DNA spezifische Primer verwendet. PCR-Reaktionen ohne DNA (Mock) dienen als Kontrolle. Die Primersequenzen befinden sich in Tabelle 3 im Anhang. Die Größen der zu erwartenden PCR-Produkte sind rechts dargestellt. *cp33a-1*: 33A-1_neu_for und 33A-1_neu_rev: 464 bp, 33A-1_neu_rev und LBb1: 528 bp; *cp33a-2*: 33A-2_for und 33A-2_rev: 729 bp, 33A-2_for und LBb1: 545 bp; *cp33a-3*: 33A-2_for und 33A-2_rev: 729 bp, 33A-2_for und LB2: 609 bp.



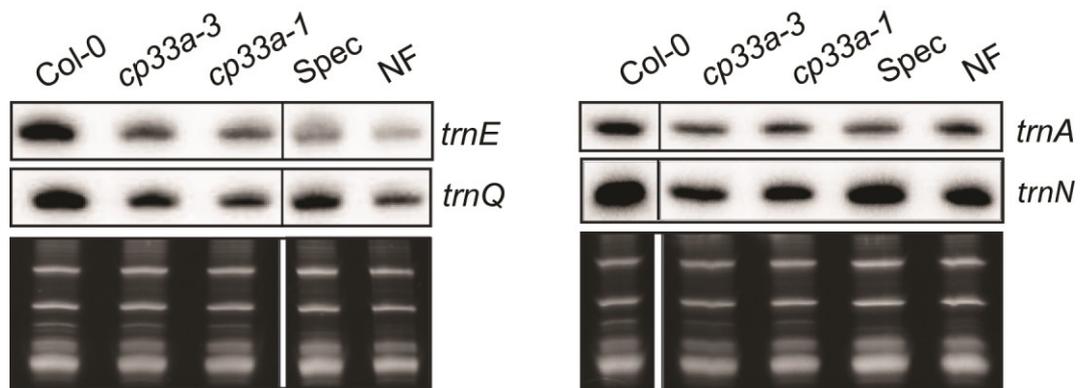
Anhang Abb. 3: Reduzierte CP33A-Proteinmengen in Pflanzen der *cp33a-2* Linie

Immunologische Untersuchung mit anti-CP33A (Antikörper a) von Gesamtproteinextrakten von wildtypischen (Col-0) und homozygoten Pflanzen der *cp33a-2* Linie. Gleiche Proteinmengen wurden per SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Ein Ausschnitt der Ponceaufärbung ist gezeigt (RbcL) und diente als Ladekontrolle. Die Signale wurden mittels der Image Lab Software (Bio-Rad) gemessen. Im Durchschnitt ergibt sich eine Reduktion der CP33A-Proteinmenge von 70% in den *cp33a-2* Pflanzen gegenüber dem Wildtyp. Die Analyse wurde ein weiteres Mal mit gleichem Ergebnis wiederholt.



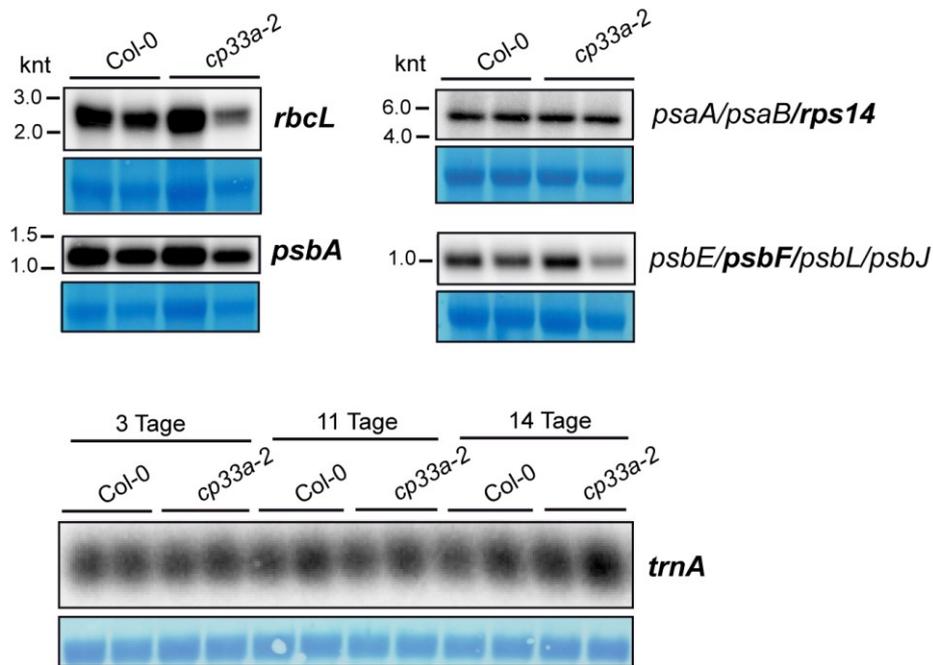
Anhang Abb. 4: Albinotischer Phänotyp von Spectinomycin-behandelten Wildtyp-Pflanzen und *cp33a*-Nullmutanten

Wildtyp Columbia-0 und *cp33a-1* Pflanzen wuchsen 14 Tage unter Standardwachstumsbedingungen auf MS-Medium mit Saccharose (3%). Das Medium der Wildtyp-Pflanzen enthielt zusätzlich Spectinomycin (500µg/ml). Auf der Platte mit den *cp33a*-Mutanten wuchs zum Vergleich eine Wildtyp Pflanze.



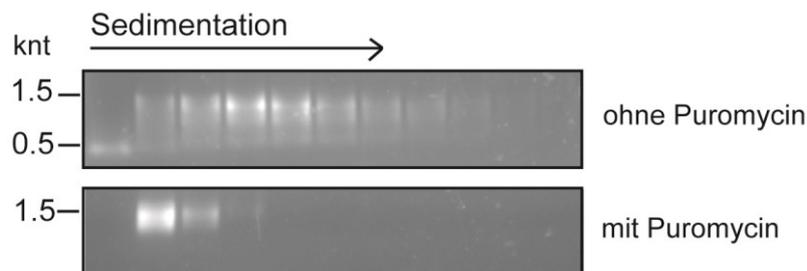
Anhang Abb. 5: Reduktion von tRNAs in *cp33a*-Nullmutanten

RNA wurde aus Wildtyp, Spectinomycin-behandelten Wildtyp und *cp33a-1* Pflanzen extrahiert, auf einem 9% Polyacrylamidgel aufgetrennt und nach der Übertragung auf eine Nylonmembran mit radioaktiv markierten Sonden für plastidäre tRNAs hybridisiert (Primersequenzen s. Tabelle 3, Anhang). Die Färbung der kurzen cytosolischen RNAs mit Ethidiumbromid diente der Beladungskontrolle. Die Analyse wurde ein weiteres Mal (Ausnahme *trnE*) mit gleichem Ergebnis wiederholt.



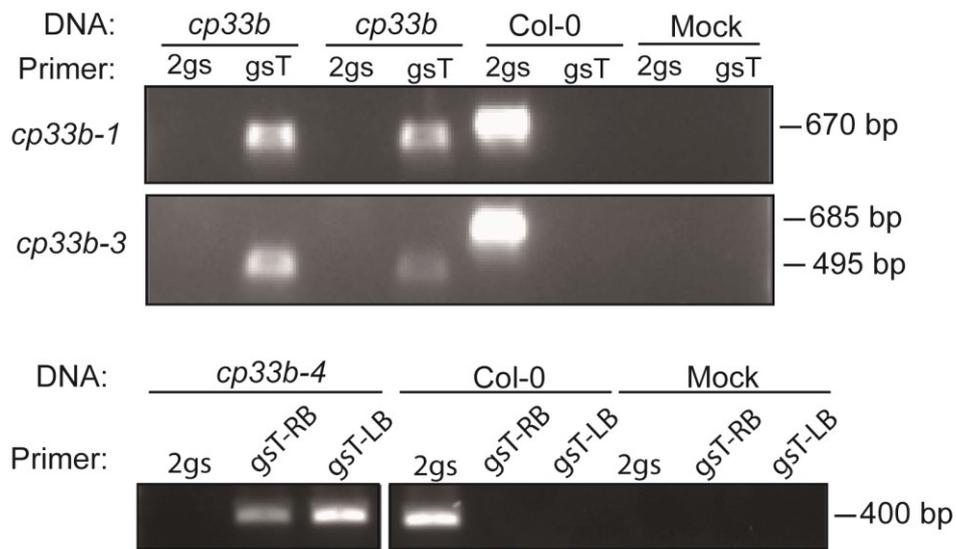
Anhang Abb. 6: Keine veränderten Transkriptmengen in den *cp33a-2* Pflanzen

RNA wurde aus Wildtyp (Col-0) und *cp33a-2*-Nullmutanten extrahiert, auf einem 1,2% Agarosegel aufgetrennt und nach der Übertragung auf eine Nylonmembran mit radioaktiv markierten Sonden für plastidäre RNAs hybridisiert (fettgedruckt; Primersequenzen s. Tabelle 3, Anhang). Ein Ausschnitt der Methylenblau-Färbung (25S rRNA) wurde als Beladungskontrolle genutzt.



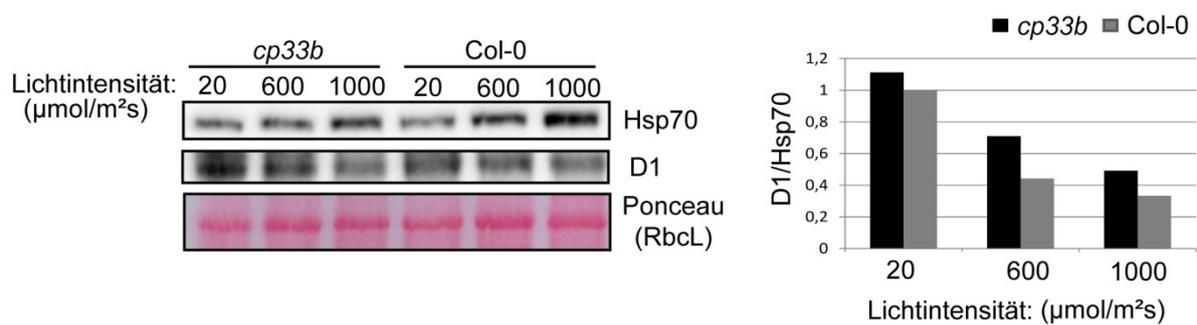
Anhang Abb. 7: Puromycin-Behandlung setzt RNAs von Polysomen frei

Chloroplastenextrakte wurden mit bzw. ohne Puromycin (0,5 mg/ml) behandelt und anschließend auf einem Saccharosegradienten (15%-55%) größenfraktioniert. Die isolierte RNA aus den einzelnen Fraktionen wurde mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und anschließend mit Ethidiumbromid gefärbt. Experiment durchgeführt von Raphael Trösch.



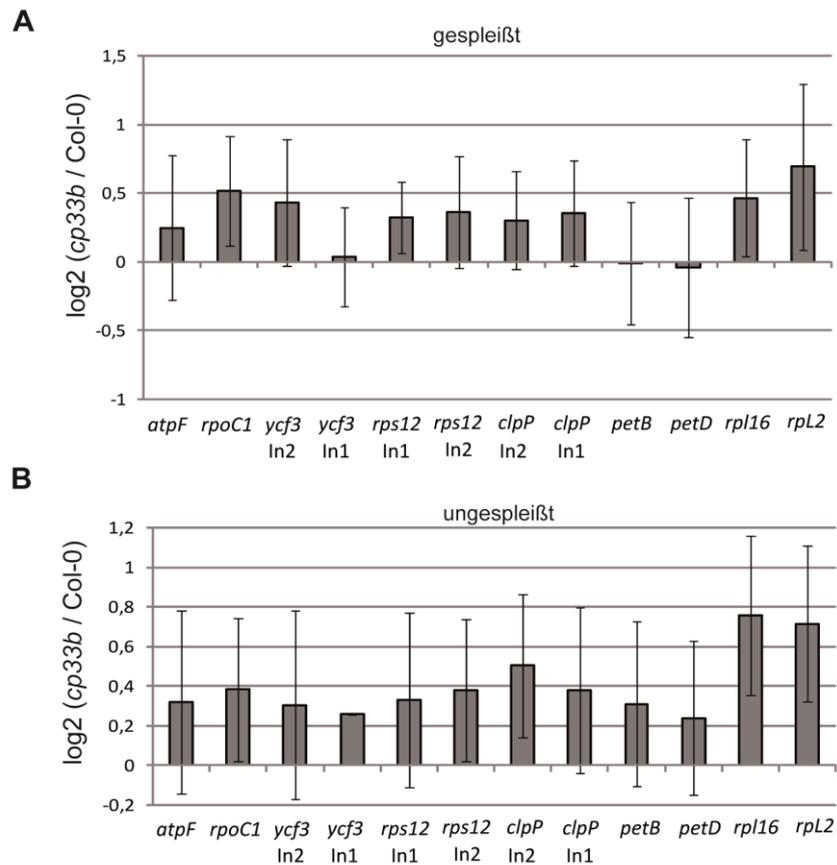
Anhang Abb. 8: Genotypisierung-PCRs von *cp33b*-Mutanten

Gesamt-DNA wurde aus Wildtyp-Pflanzen (Columbia-0) und *cp33b*-Mutanten Linien (*cp33b-1*, *cp33b-3* und *cp33b-4*) isoliert und in PCR-Reaktionen eingesetzt. Es wurden pro Reaktion zwei genspezifische Primer (2gs) oder ein genspezifischer und ein T-DNA spezifischer Primer eingesetzt (gsT). Im Fall von *cp33b-1* und *cp33b-3* erfolgte der Nachweis der T-DNA mittels Primern der Linken Grenze (LB, left border), wogegen für *cp33b-4* PCRs sowohl Primer der Linken als auch der Rechten Grenze (RB, right border) gewählt wurden. PCR-Reaktionen ohne DNA (Mock) dienten als Kontrolle. Primer-Sequenzen befinden sich in Tabelle 3 im Anhang. *cp33b-1*: 33B-1_for und 33B-1_rev: 676 bp, 33B-1_for und LBb1: 614 bp; *cp33b-3*: 33B-2_for und 33B-2_rev: 685 bp, 33B-2_rev und T-DNA-LB: 495 bp; *cp33b-4*: 33B-4_for und 33B-4_rev: 323 bp, 33B-4_rev und RB_SK1: ~420 bp, 33B-4_for und LB_SK1: ~430 bp.



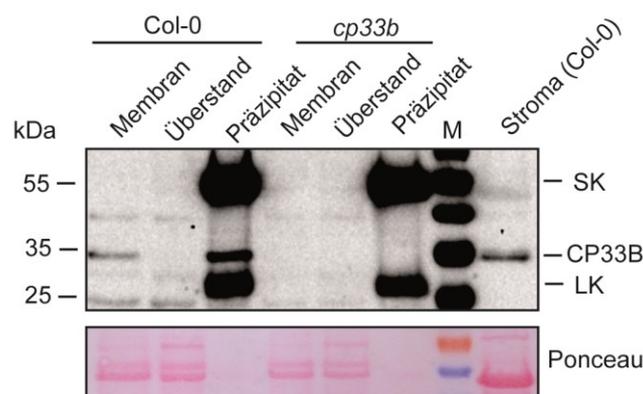
Anhang Abb. 9: Keine Reduktion der D1-Gesamtproteinmengen unter Schwach- und Starklicht in *cp33b*-Nullmutanten gegenüber Wildtyp-Pflanzen

Immunologischer Nachweis von D1 in Gesamtproteinextrakten von 14 Tage alten *cp33b* und Wildtyp-Pflanzen, die unter verschiedenen Lichtintensitäten (20, 600 und 1000 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) angezogen wurden. Proteine wurden per SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Detektion von Hsp70 diente als Beladungskontrolle. Signale wurden mit der Image Lab Software (Bio-Rad) quantifiziert und auf das Hsp70-Signal normalisiert (siehe Balkendiagramme rechts).



Anhang Abb. 10: Transkriptmengen gespleißter und ungespleißter mRNAs in *cp33b*-Nullmutanten

Quantitative Real-time (qRT)-PCR wurde genutzt um die Transkriptmengen von gespleißten und ungespleißten mRNAs in drei Tage alten Wildtyp-Pflanzen und *cp33b*-Mutanten zu ermitteln. Es wurden jeweils drei biologische Replikate untersucht. Die Messung der *Actin*-mRNA diente zur Normalisierung der relativen RNA-Konzentrationen. Log₂ Quotienten von gespleißten (A) und ungespleißten Introns (B) in *cp33b*-Mutanten Pflanzen gegenüber dem Wildtyp (komplette Daten s. Tabelle 12, Anhang). Standardabweichungen sind als vertikale Linien dargestellt. Eine Signifikanzanalyse mittels ungepaarten Zweistichproben-t-Test (zweiseitig) ergab für keines der Transkripte einen Wahrscheinlichkeitswert $P \leq 0,01$. Abkürzung: In1, In2 = Intron1, Intron2.



Anhang Abb. 11: Immunpräzipitation von CP33B aus Membranen

Western-Analysen der Immunpräzipitations-Fractionen mit anti-CP33B auf Membranen aus Wildtyp und *cp33b*-Nullmutanten. Membran-Fractionen wurden aus isolierten Chloroplasten, nach Trennung in Stroma und Membran und anschließend fünfmaliger Waschung, präpariert. Jeweils ein Teil der Membran-Fractionen welche für die IPs verwendet wurden, sowie 1/20 der Überstand- und 1/10 der Präzipitat-Fractionen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt. Zusätzlich erfolgte die Auftragung von Wildtyp-Stroma, welche die Abreicherung von RuBisCO in den Membran-Fractionen gegenüber der Stromafraktion durch die Ponceaufärbung sichtbar macht. Banden markiert mit SK und LK repräsentieren die schweren bzw. leichten Ketten der für die Immunpräzipitation verwendeten Antikörper.

Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Oligonukleotide. Diese wurden für Genotypisierungen, GFP-Klonierungen, Northern- und *Dot-Blot*-Analysen oder Edierungsanalysen verwendet. RT= reverse Transkription.

Primername	Sequenz (5' --> 3')	Ziel	Bemerkung
Genotypisierung			
33A-1_neu_for	GTGAGAACGAAGTAATGAGAACC	<i>cp33a</i>	
33A-1_neu_rev	CACTAACATTTCGAAAGCACCTCG	<i>cp33a</i>	
33A-2_for	GCTTAATGGACTTGAAGAATGACC	<i>cp33a</i>	
33A-2_rev	CTTCTTCTTCTACTGATGCCTGG	<i>cp33a</i>	
33B-1_for	CCGAAATCACCGAACGATCTTCC	<i>cp33b</i>	
33B-1_rev	CTCGGTATGAAGGAGCAGGATGG	<i>cp33b</i>	
33B-2_for	ATGGATTGGAGACGTCTGGCTGG	<i>cp33b</i>	
33B-2_rev	TCTCCGCGACGGAACAGAGTACG	<i>cp33b</i>	
33B-4_for	CGTACTCTGTTCCGTCGCGGAGA	<i>cp33b</i>	
33B-4_rev	AGCCATAGTTACAAAAGCAAATCC	<i>cp33b</i>	
LBb1	GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT	pBIN-pROK2, Salk T-DNA Vektor	
LB2	GCTTCCTATTATATCTTCCCAAATTACCAATACA	pCSA104, Sail T-DNA Vektor	
LB_SK1	CGATTGTACCTGCGTTCAAATAC	pSKI015, SK-Linie T-DNA Vektor	
RB_SK1	AAGGTGCCGATATCATTACGAC	pSKI015, SK-Linie T-DNA Vektor	
T-DNA-LB	CCCATTGGACGTGAATGTAGACAC	pAC161, Gabi-Kat T-DNA Vektor	
GFP-Klonierung			
pA7-GFP_fw	CTCAAGCAATCAAGCATTCTACTTC	pA7-GFP Vektor	
pA7-GFP_rev	AGATGAACTTCAGGGTCAGCTTG	pA7-GFP Vektor	
33A.rev.3UTR	CGGAATCTATTGTGCTTTTGC	<i>cp33a</i>	
33A.fw.5UTR	TAGGAAAAACTTTCATCAAAAATCG	<i>cp33a</i>	
33A.fw.xhoI.TP	ATACTCGAGATGTCGTCAGCTTATTGTTCC	<i>cp33a</i>	
33A.fw.ncoI.cDNA	ATACCATGGCACTAACATTCGAAAGCACC	<i>cp33a</i>	
33B.fw.5UTR	TAGTGCCAAAGCTAACAATGG	<i>cp33b</i>	
33B.rev.3UTR	CATGCTCCTATCGATAACAGAG	<i>cp33b</i>	
33B.fw.xhoI.TP	ATACTCGAGATGGCGGTTTTGGAAGC	<i>cp33b</i>	
33B.rev.ncoI.cDNA	ATACCATGGCCACAATGTTTTCTTCG	<i>cp33b</i>	
Radioaktive Sonden			
accD.AT.for	TTCATTTGTAGTGAAAGCGG	<i>accD</i>	RNA-Sonde
accD.AT7.rev	GTAATACGACTCACTATAGGGTTCGCCTACTACGGA TCCC	<i>accD</i>	RNA-Sonde
CK_atpB_for2	GGAATGGACGTGGTTGATATGG	<i>atpB</i>	RNA-Sonde
CK_atpB_T7_rev2	TAATACGACTCACTATAGGGCAGTCAGACCAACTC TCATACG	<i>atpB</i>	RNA-Sonde
CK_atpH5'_for	GATTTAGATAGGGATTCGATTAG	<i>atpH</i>	RNA-Sonde
CK_atpH5'_T7_rev	GTAATACGACTCACTATAGGGTCCAGGTCCAATAGA AGCAAG	<i>atpH</i>	RNA-Sonde

Primername	Sequenz (5' --> 3')	Ziel	Bemerkung
Ck_psbD_for	CTATTTTCGCTTTAGGGGGTTGG	<i>psbD</i>	RNA-Sonde
Ck_psbD_T7_rev	TAATACGACTCACTATAGGGCAGCAATGGGACCAG AGAATGC	<i>psbD</i>	RNA-Sonde
CK_rbcL_for	GCAGCATTCCGAGTAACTCC	<i>rbcL</i>	RNA-Sonde
CK_rbcL_T7	GTAATACGACTCACTATAGGGCCACGTAGACATTCA TAAACTGC	<i>rbcL</i>	RNA-Sonde
CK-petB-for	CGTCCAACCGTTACTGAAGC	<i>petB</i>	RNA-Sonde
CK-petB-T7-rev	GTAATACGACTCACTATAGGGAATAGCGTCAGGTAC ACC	<i>petB</i>	RNA-Sonde
CK-psbF-for	GTCTGGAAGCACAGGAGAACG	<i>psbF</i>	RNA-Sonde
CK-psbF-T7-rev	GTAATACGACTCACTATAGGGCAAACGGCCTGTTA TTAATGG	<i>psbF</i>	RNA-Sonde
clpP_ex2_for	GAGGTTGATACCGAAATCTCG	<i>clpP</i>	RNA-Sonde
T7_clpP_ex2_rev	GTAATCGACTCACTATAGGGCGTTTGTAATTGCTC CTCC	<i>clpP</i>	RNA-Sonde
ndhBex1.rp	CCGATGGAGAGAAGAACCTATG	<i>ndhB</i>	RNA-Sonde
ndhBex1.T7	GTAATCGACTCACTATAGGGTAGCCAAGAGAAACC ATGAACC	<i>ndhB</i>	RNA-Sonde
ndhK.rp	CTATGGCCGCTTCTTTATGG	<i>ndhK</i>	RNA-Sonde
ndhK.T7	GTAATCGACTCACTATAGGGATTTCCAATATGCGGA CTGC	<i>ndhK</i>	RNA-Sonde
psbA.MT1	GTGCATAAGAATGTTGTGCTCAG	<i>psbA</i>	RNA-Sonde
psbA.rp	CATTCATTGCTGCTCCTCCAG	<i>psbA</i>	RNA-Sonde
psbA.t7neu	GTAATCGACTCACTATAGGGATTCCTAGAGGCATAC CATCAG	<i>psbA</i>	RNA-Sonde
psbC.rp	AGTGGCCCATTTTGTACCTG	<i>psbC</i>	RNA-Sonde
psbC.T7	GTAATCGACTCACTATAGGGCCCCCAAAGGGAGAT TTTAG	<i>psbC</i>	RNA-Sonde
rpoC1.rp	TTGGACCTATAAAGAGTGGAATTTG	<i>rpoC1</i>	RNA-Sonde
rpoC1.T7.2	GTATTACGACTCACTATAGGGAGGTCTTCTTTTCAC GAGGTACG	<i>rpoC1</i>	RNA-Sonde
rps14.rp	GCAAAGAAAAGTTTGATTTATAGGG	<i>rps14</i>	RNA-Sonde
rps14.T7	GTAATCGACTCACTATAGGGTTACCAGCTTGATCTT GTTGC	<i>rps14</i>	RNA-Sonde
rps15.rp	TGCACAAATATGAGGGATTGTT	<i>rps15</i>	RNA-Sonde
rps15.T7	GTAATACGACTCACTATAGGGCCAGCAGTCGTTGA CGTTT	<i>rps15</i>	RNA-Sonde
rps8fwd	GGAAACATCGCGAAAACAACC	<i>rps8</i>	RNA-Sonde
rps8rev.T7	GTAATACGACTCACTATAGGGCGAGCTTCTCGGTCT GTCATT	<i>rps8</i>	RNA-Sonde
rrn16.rp	ATGGATACTAGGCGCTGTGC	<i>rrn16</i>	RNA-Sonde
rrn16.T7	GTAATCGACTCACTATAGGGACCTCCTCCGGCTTA TCAC	<i>rrn16</i>	RNA-Sonde
rrn23.rp	CCTAGATGGCGAGAGTCCAG	<i>rrn23</i>	RNA-Sonde
rrn23.T7	GTAATCGACTCACTATAGGGAAGACTCGCTTTCGCT ACG	<i>rrn23</i>	RNA-Sonde
trnN.T7	GTAATACGACTCACTATAGGGTGAACCTCGGGAG AATCG	<i>trnN</i>	RNA-Sonde
trnN_rev_mt	TCTCCCGTTGTTCCTCAGTAGC	<i>trnN</i>	RNA-Sonde
trnQ.rev	CATTTTGAATTGACGAACAACC	<i>trnQ</i>	RNA-Sonde

Anhang

Primername	Sequenz (5' --> 3')	Ziel	Bemerkung
trnQ.T7	GTAATACGACTCACTATAGGGCCTTACTTACCCGCA TCACAC	<i>trnQ</i>	RNA-Sonde
ycf1.rp	GAAACTTGGGATAGCTTCCTATTTG	<i>ycf1</i>	RNA-Sonde
ycf1.T7	GTAATACGACTCACTATAGGGGCCTTCTGAGATGCT TGAAATTTAG	<i>ycf1</i>	RNA-Sonde
ycf2.fw	TTTCTCTGACAGATGGTCAGAACTTC	<i>ycf2</i>	RNA-Sonde
ycf2.T7	GTAATACGACTCACTATAGGGCTCTTCTGACTCGTG GCGTA	<i>ycf2</i>	RNA-Sonde
ycf3_ex2_for	CTCAATCTGAAGGAAATTATGC	<i>ycf3</i>	RNA-Sonde
T7_ycf3_ex2_rev	CACAGCCATATTATTAAGC	<i>ycf3</i>	RNA-Sonde
psbA(7)	AAGCGACCCCATAGGCTTTTCGCTTTTCGCGTCTCTC TAAAATTGCAGTCAT	<i>psbA</i>	Oligo-Sonde
psbA(10a)	AAAACAGCAGTCGCAGCTGCAACAGGAGCTGAAT ATGCAACAGCAATCCA	<i>psbA</i>	Oligo-Sonde
rbcL	GAACCTTCTCAAAAAGGTCTAAAGGGTAAGCTAC ATAAGCAATATATTG	<i>rbcL</i>	Oligo-Sonde
trnAex1	TTGCAAGAGCGGAGCTCTACCAACTGAGCTATATC CCC	<i>trnA</i>	Oligo-Sonde
trnG probe	GAAAGAGAGATGTCCTGAACCACTAGACGATGGG GGC	<i>trnE</i>	Oligo-Sonde
Atrn23fw	CCCAGAGACGAGGAAGGGC	<i>rrn23</i>	PCR-Sonde
Zmrrn23rev	CCTCCCACTGCTTGGGAGC	<i>rrn23</i>	PCR-Sonde
At-rps2 fw	TTTTGATGCGGCAAGTAGGGG	<i>rps2</i>	PCR-Sonde
At-rps2 rev	AACGGCCCTCACAAATTGCG	<i>rps2</i>	PCR-Sonde
Edierungsanalyse			
clpP.At.2rev	TGAACCGCTACAAGATCAAC	<i>clpP</i>	RT
matK.At.rev	AGCGGCGTATCCTTTGTTGC	<i>matK</i>	RT
ndhD.At.for	CAAGCCTAATTCTATCATAACTCG	<i>ndhD</i>	RT
accD.AT.for	TTCATTTGAGTGAAAGCGG	<i>accD</i>	PCR
accD.AT.rev	TTTCGCCTACTACGGATCCC	<i>accD</i>	PCR
atpF_ex1for	TTTCGTTTACTTGGGTCACTGG	<i>atpF</i>	PCR
atpF_ex2rev	ATCAAATCAATTTTCTCGTTC	<i>atpF</i>	PCR
clpP.AT.2rev	TGAACCGCTACAAGATCAAC	<i>clpP</i>	PCR
clpP.AT.for	GTAATGATCCATCAACCCGC	<i>clpP</i>	PCR
matK.AT.for	CGTTACCGGGTAAAAGATGC	<i>matK</i>	PCR
matK.AT.rev	AGCGGCGTATCCTTTGTTGC	<i>matK</i>	PCR
ndhD.AT.for	CAAGCCTAATTCTATCATAACTCG	<i>ndhD</i>	PCR
ndhD.AT.rev	AAGTTTATATGGTTCGAACG	<i>ndhD</i>	PCR
ndhF.AT.for	AAAACCTTCGCCGATGTGG	<i>ndhF</i>	PCR
ndhF.AT.rev	GCATTCGCTGCAATAGGTGC	<i>ndhF</i>	PCR
psbZ.AT.for	GCTTTCCAATTGGCAGTTTTTG	<i>psbZ</i>	PCR
psbZ.AT.rev	CCACCAAGAAGACTAATCCAATCC	<i>psbZ</i>	PCR
rps14.AT.for	TTATAGGGAGAAGAAGAGGC	<i>rps14</i>	PCR
rps14.AT.rev	TACCAGCTTGATCTTGTTGC	<i>rps14</i>	PCR

Tabelle 4: Verwendete Antikörper. Alle Antikörper stammen aus Kaninchen, mit Ausnahme von Anti-*Rabbit* IgG HRP, welcher aus Ziege stammt. AK=Antikörper, Av. = Arbeitsverdünnung während des Immunoblots.

Antikörper	Bezugsquelle	Bemerkungen
AtpA-AK	Agrisera	Immunoblot, Av.: 1:10000
CoxII-AK		Immunoblot, Av.: 1:5000
CP33A (a)-AK	Pineda-Antikörper-Service	Immunoblot, Av.: 1:1000
CP33A (b)-AK	Pineda-Antikörper-Service	Immunopräzipitation
CP33B-AK	Pineda-Antikörper-Service	Immunopräzipitation und Immunoblot, Av.: 1:1000
D1-AK	Agrisera	Immunoblot, Av.: 1:1000
GSAT-AK	Prof. Dr. B. Grimm (HU Berlin)	Immunoblot, Av.: 1:5000
Hsp70-AK	Agrisera	Immunoblot, Av.: 1:1000
NdhH-AK		Immunoblot, Av.: 1:1000
PetD-AK	Agrisera	Immunoblot, Av.: 1:1000
PetA-AK	Agrisera	Immunoblot, Av.: 1:1000
PsbP-AK	Agrisera	Immunoblot, Av.: 1:5000
PsaD-AK		Immunoblot, Av.: 1:1000
PsaA-AK		Immunoblot, Av.: 1:5000
RbcL-AK	Agrisera	Immunoblot, Av.: 1:10000
Goat Anti- <i>Rabbit</i> IgG, HRP	Sigma	Immunoblot, Sek. Antikörper, Av.:
<i>Rabbit</i> -IgG	NEP	Immunopräzipitation

Tabelle 5: Wertetabelle der CP33A RIP-Chip-Analyse (gesamte Plastom) von Gesamtpflanzenextrakten mit und ohne Puromycin-Behandlung. Die grafische Darstellung der Daten (Median(*Median of Ratios* (635/532))) befindet sich in Abb. 16. Auf einem *Microarray*-Chip befinden sich pro PCR-Sonde 12 Replikate. Die Fluoreszenzsignale von mindestens 6 Replikaten/Spots pro PCR-Sonde mussten über dem Hintergrund liegen, ansonsten wurden die Daten aus der Analyse ausgeschlossen. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte aus zwei RIP-Chip-Analysen (= max. 24 Replikate) von CP33A auf Pflanzengewebe welches zuvor entweder mit oder ohne Puromycin behandelt wurde und zwei Kontrollen mit IgG auf Gewebe ohne Puromycin. Aus den hintergrundbereinigten Präzipitat- (635 nm) und Überstand- (532 nm, nicht abgebildet) Fluoreszenzsignalen wurden die Median(*Median of Ratios*) gebildet und auf die Summe der hintergrundbereinigten (532 nm) Fluoreszenzen der ribosomalen rRNAs normalisiert.

Name	Anzahl der Replikate			Median(F635 Median – B635)			Median(<i>Median of Ratios</i> (635/532))		
	CP33A +Puro	CP33A -Puro	IgG -Puro	CP33A +Puro	CP33A -Puro	IgG -Puro	CP33A +Puro	CP33A -Puro	IgG -Puro
H-psbA	21	24	18	656	416	100	1,402	0,659	0,268
psbA	21	23	13	21134	709	76	4,994	1,422	0,335
psbA-Kex2	24	24	24	3445,5	1501,5	359	3,674	1,250	0,476
Kex2-matK	24	24	22	1064	600	383,5	1,627	0,858	0,503
matK-1	17	13	24	748	374	358	2,517	1,168	0,659
Kint	23	24	23	552	340,5	263	1,762	1,073	0,572

Anhang

Name	Anzahl der Replikate			Median(F635 Median – B635)			Median(<i>Median of Ratios</i> (635/532))		
	CP33A +Puro	CP33A -Puro	IgG -Puro	CP33A +Puro	CP33A -Puro	IgG -Puro	CP33A +Puro	CP33A -Puro	IgG -Puro
Kint-Kex1	24	23	22	813	509	272,5	1,488	0,890	0,461
IG_K-rps16	24	23	23	732,5	495	297	1,165	0,838	0,518
rps16ex2	23	24	24	589	376,5	238,5	1,206	0,804	0,525
rps16ex2-in-ex1	24	24	24	779,5	526	395,5	1,326	0,837	0,525
rps16in-1	24	24	12	452	411,5	271,5	0,992	0,823	0,424
rps16in-2	24	23	24	434,5	359	214	1,051	0,899	0,573
rps16ex2-IG	23	24	23	507	428,5	283	1,082	0,807	0,523
Q	24	24	24	1046	1380,5	1340,5	0,295	0,326	0,338
psbK	23	23	24	1705	879	352	3,395	0,854	0,406
psbI-S	21	24	24	2424	1242	446,5	2,422	0,934	0,457
IG-psbI-G-1	24	24	23	4867,5	4277	4349	0,451	0,309	0,427
IG-psbI-G-2	24	24	12	5637	1637	1231,5	2,398	0,844	0,227
Gex1-in	24	24	24	2809	1503	629,5	1,612	0,746	0,377
in-Gex2	24	24	23	1377	938	846	0,885	0,498	0,246
Gex2-R	24	23	24	555	442	360	1,100	0,551	0,390
atpA-1	24	24	23	1154	522	434	1,642	0,922	0,390
atpA-3	24	24	24	949	496,5	333,5	2,189	1,041	0,560
atpA-atpFex2	24	22	23	1904	1129,5	439	2,903	1,192	0,553
atpFex2-in	24	24	24	2264,5	1039	403	3,222	1,300	0,492
atpFex2-in-ex1	24	24	24	3249	1615,5	617	3,099	1,254	0,507
atpFin-ex1	23	23	23	790	575	244	2,161	0,986	0,504
atpFex1-IG	24	24	24	2959	1567	349,5	3,084	1,295	0,422
atpH	22	24	24	1061	607,5	248	2,035	1,017	0,523
atpH-IG	24	24	24	4048	1310	655	3,464	1,009	0,525
IG-atpI	23	24	24	1670	687,5	320	2,471	1,083	0,601
atpI	21	24	24	1496	703	359	2,914	1,072	0,603
atpI-rps2	21	23	24	1963	919	457	3,061	1,172	0,635
rps2	24	24	24	601,5	403,5	275,5	1,492	0,905	0,471
rps2-IG	21	16	12	603	322	295,5	1,842	1,202	0,591
rpoC2-1	24	23	23	717,5	549	301	1,255	0,969	0,747
rpoC2-2	24	24	12	1242,5	750,5	1121,5	1,610	1,108	0,803
rpoC2-3	24	24	24	1020	515	318,5	1,692	1,045	0,625
rpoC2-5	24	24	24	442	380,5	192,5	1,174	1,017	0,655
rpoC2-6	24	24	24	840,5	488	341,5	1,397	1,031	0,626
rpoC2-rpoC1-2	24	23	24	538	340	358,5	2,024	1,230	1,080
rpoC1ex1-2	15	18	12	1019	423,5	378	1,453	1,157	1,010
rpoC1ex1-in	24	24	23	604	465,5	335	1,366	1,023	0,766
rpoC1ex1-in-ex2	23	24	21	645	476	337	1,233	1,016	0,613
rpoC1in	24	24	24	777,5	569,5	335	1,386	1,057	0,710
rpoC1in-ex2	23	24	20	407	313,5	150	1,288	0,915	0,598
rpoC1-rpoB-1	24	24	23	603	443,5	304	1,378	0,952	0,596
rpoC1-rpoB-2	24	24	24	786,5	543,5	395	1,323	1,026	0,630
rpoB-1	24	24	24	1231	541	594,5	2,135	1,169	0,779
rpoB-2	20	24	20	451,5	353	195	1,649	1,139	0,880

Name	Anzahl der Replikate			Median(F635 Median – B635)			Median(<i>Median of Ratios</i> (635/532))		
	CP33A +Puro	CP33A -Puro	IgG -Puro	CP33A +Puro	CP33A -Puro	IgG -Puro	CP33A +Puro	CP33A -Puro	IgG -Puro
rpoB-3	20	24	23	450	493	239	1,062	0,928	0,520
rpoB-4	24	24	20	389	278	220	1,284	0,994	0,655
rpoB-IG	22	24	23	459	348	238	1,071	0,942	0,646
IG rpoB-C	20	24	24	711	523	298,5	1,376	0,940	0,553
IG-C	21	24	24	926	1244,5	816,5	0,353	0,408	0,313
C-IG	22	24	23	512	352,5	310	0,940	0,629	0,656
petN-IG	23	24	24	806	474	231	1,397	0,849	0,458
psbM	24	24	23	369	269,5	151	1,535	0,841	0,429
D	24	24	23	691,5	668	487	0,454	0,403	0,364
Y	24	23	23	657,5	515	388	0,627	0,512	0,325
E	24	24	24	598	605,5	319,5	0,630	0,537	0,428
IG E-T	24	24	24	477,5	370	216,5	1,084	0,863	0,589
T	21	24	24	405	447,5	214,5	0,642	0,444	0,307
IG T-psbD-1	23	23	24	1587	869	318	2,415	0,992	0,410
IG T-psbD-2	24	24	22	2958,5	920	385	4,008	1,184	0,358
psbD-1	24	24	24	6942,5	1851,5	607,5	6,171	1,536	0,519
psbD-2	24	24	24	2838,5	1255	303	4,235	1,514	0,517
psbD-psbC	23	23	22	2794	980	332,5	5,308	1,439	0,461
psbC-1	24	24	23	2038,5	1195,5	546	3,646	1,315	0,377
psbC-2	24	24	12	3768	2151	401	5,667	1,779	0,254
psbC-S	21	24	24	2777	1428	443,5	2,255	0,886	0,370
S-psbZ	24	24	24	4809,5	1456,5	544	3,637	1,273	0,493
IG psbZ-G	24	24	12	1368	610	223,5	2,147	0,994	0,806
G-fM	24	24	24	850	538	433,5	0,742	0,442	0,388
fM-rps14	24	24	24	1689	1184,5	1304	0,619	0,325	0,420
rps14-psaB-1	23	23	24	5705	2117	700	4,143	1,423	0,529
rps14-psaB-2	24	24	24	4107	1546	617,5	4,112	1,434	0,563
psaB-1	24	24	12	11256,5	2985	1393	6,998	1,683	0,360
psaB-2	24	23	24	1278,5	857	338	3,662	1,288	0,669
psaB-psaA-1	24	24	24	2225,5	898	401	4,587	1,463	0,603
psaB-psaA-2	24	24	24	2166	862	469,5	3,750	1,326	0,602
psaA-1	24	24	12	1085,5	395	571	3,607	1,072	0,373
psaA-2	24	24	23	1124	724	283	2,390	0,993	0,466
psaA-3	21	23	24	3439	1004	569	4,737	1,177	0,590
psaA-IG-1	15	16	23	1565	436,5	266	3,526	0,806	0,426
psaA-IG-2	23	24	24	694	483,5	262,5	1,893	1,061	0,580
IG-ycf3ex3	24	24	24	847	510	381	1,715	1,062	0,632
ycf3ex3-in2	24	24	23	1035	585	337	1,854	1,054	0,673
ycf3ex3-in2-ex2	24	24	24	709,5	427	289,5	1,524	0,938	0,601
ycf3in2	23	24	20	667	462	293	1,490	0,977	0,579
ycf3ex2	22	23	23	499,5	407	253	1,501	1,011	0,680
ycf3in1	24	24	24	604,5	472	311,5	1,175	0,881	0,535
acf3ex1	20	22	12	899,5	283	283,5	1,624	0,952	0,454
S-GGA	23	24	24	663	682	595,5	0,421	0,345	0,341

Anhang

Name	Anzahl der Replikate			Median(F635 Median – B635)			Median(<i>Median of Ratios</i> (635/532))		
	CP33A +Puro	CP33A -Puro	IgG -Puro	CP33A +Puro	CP33A -Puro	IgG -Puro	CP33A +Puro	CP33A -Puro	IgG -Puro
rps4-1	22	24	23	704	551,5	335	1,535	0,959	0,568
rps4-2	23	24		1189	358,5		1,713	0,993	0,000
T-IG	24	23	24	597	496	526	0,430	0,421	0,343
L-UAA ex1-in	23	24	24	1178	978	735	0,542	0,438	0,331
L-UAA in-ex2	23	24	23	1061	1052	746	0,583	0,389	0,222
L-UAA ex2-IG	24	24	23	1696,5	1020,5	653	1,120	0,622	0,316
F-GAA-1	24	24	24	761,5	1004	442,5	0,244	0,267	0,262
F-GAA-2	24	24	24	1150	1165,5	965	0,334	0,314	0,279
ndhJ	24	23	24	709,5	350	222	1,805	1,105	0,615
ndhJ-ndhK	24	22	24	994,5	546,5	292	2,012	1,136	0,605
ndhK	24	22	24	968	538,5	277	2,380	1,161	0,782
ndhK-ndhC	22	24	24	1000,5	690	323,5	1,949	1,054	0,549
IG ndhC-V-UAA	24	24	23	539,5	383	230	1,392	0,855	0,502
Vex2-in	23	23	22	694	424	331	1,159	0,744	0,436
Vin-ex1	15	15	12	990	397	405	1,549	0,811	0,396
Vex1-atpE	23	24	12	594	419	441,5	0,675	0,421	0,198
atpE-atpB	24	23	23	599	424	226	1,460	0,949	0,483
atpB-1	24	24	23	1267,5	672,5	330	1,958	1,068	0,453
atpB-rbcL	24	24	24	1070	673	286	1,931	1,060	0,521
rbcL-1	24	24	23	7085,5	3581	804	4,041	1,309	0,471
rbcL-2	24	24	12	3099,5	1014,5	566	3,008	1,040	0,678
rbcL-3	24	23	12	5361	1371	899,5	2,244	0,724	0,663
IG rbcL-accD	23	24	24	620	435	203	1,580	0,900	0,458
accD-1	23	24	24	608	393,5	230,5	1,950	0,977	0,558
accD-2	23	24	12	3478	448	241	2,399	0,963	0,711
accD-3	24	23	24	975,5	585	307	2,207	1,053	0,524
IG accD-psaI	23	24	22	1098	694,5	265,5	1,845	0,974	0,382
psaI	23	24	24	982	587	288,5	2,401	1,103	0,594
ycf4-1	24	24	24	3901	1506,5	565	4,089	1,417	0,455
ycf4-2	24	24	24	1524,5	825	407,5	2,381	1,095	0,540
cemA-1	21	24	24	1081	590,5	207,5	3,070	1,142	0,497
cemA-2	22	23	24	1398	752	269	2,614	1,129	0,468
cemA-3	24	24	24	2235,5	944	423	2,963	1,226	0,473
petA-1	24	22	24	815,5	472,5	281,5	1,819	1,031	0,591
petA-2	24	24	24	1538	940	326,5	2,374	1,046	0,475
petA-3	24	23	23	907,5	564	237	1,785	0,968	0,454
IG petA-psbJ	24	24	24	1359	779,5	349,5	2,099	1,050	0,499
psbJLF	24	24	23	8142	3762	780	4,551	1,462	0,530
psbFE	21	24	23	3218	975	425	4,099	1,059	0,330
IG psbE-petL-1	20	24	24	1401	783,5	311,5	2,173	0,943	0,392
IG psbE-petL-2	24	24	23	737,5	520,5	268	1,468	0,880	0,413
IG psbE-petL-3	22	23	12	688	437	312,5	1,836	0,960	0,368
petL	24	24	13	2251	920	527	2,872	1,049	0,301
petG-W-CCA	24	24	23	1167	733	468	1,503	0,802	0,529

Name	Anzahl der Replikate			Median(F635 Median – B635)			Median(<i>Median of Ratios</i> (635/532))		
	CP33A +Puro	CP33A -Puro	IgG -Puro	CP33A +Puro	CP33A -Puro	IgG -Puro	CP33A +Puro	CP33A -Puro	IgG -Puro
P-UGG	24	24	24	875,5	683	554	0,513	0,367	0,263
psaJ	24	24	24	3795	1701	604,5	3,452	1,274	0,353
IG psaJ-rpl33	24	24		2962,5	1301,5		2,345	0,969	0,000
rpl33	23	24	23	713	413,5	221	2,280	0,988	0,479
rpl33-rps18	24	24	24	2076	827	403	2,213	0,951	0,472
rpl20	15	12	24	2228	809	443,5	1,696	0,835	0,518
rpl20-IG	24	24	24	712,5	449,5	320,5	1,460	0,971	0,623
in1-rps12ex1	23	24	24	733	457	268,5	1,483	0,882	0,515
rps12ex1-clpPex3	23	24	12	2065	710	255,5	1,667	0,893	0,652
in2-clpPex2	24	24	24	643,5	446,5	256,5	1,499	0,940	0,513
clpPex2-in1	23	24	22	671	459,5	240,5	1,418	0,943	0,567
clpPin1	24	24	24	740,5	535	328,5	1,521	0,962	0,538
clpPex1	24	23	23	3062,5	1188	511	3,405	1,161	0,410
psbB-1	24	24	23	4814,5	1699	443	6,909	1,804	0,610
psbB-2	24	24	24	1091	922	283	4,755	1,866	0,618
psbBTN	23	24	24	1496	692	278	3,269	1,220	0,494
psbNH	24	24	24	1802	934	534,5	1,955	0,831	0,419
psbH-petBex1-in	21	24	24	743	539	292,5	2,030	1,058	0,538
petBin	20	24	24	1217	649	295	2,386	0,983	0,495
petBin-ex2	24	24	23	2445,5	1175	579	2,744	1,085	0,396
petBex2	24	24	24	2009,5	981,5	477	2,831	1,204	0,560
petBex2-petDex1-in	24	23	24	2599	1280	471,5	2,643	1,111	0,442
petDin	24	24	24	1122	718,5	337,5	2,200	1,031	0,500
petDex2	24	24	24	2089,5	947,5	534,5	2,673	1,073	0,580
petD-rpoA	24	24	20	607	431	247,5	1,338	0,865	0,452
rpoA	21	24	24	676	483	260	1,580	0,999	0,694
rpoA-rps11	20	22	24	577,5	407	219,5	1,363	0,940	0,601
rps11-rpl36	24	24	24	802,5	461,5	291	1,608	0,932	0,560
IG rpl36-rps8	23	24	12	574	403,5	365,5	1,565	0,895	0,497
rps8	24	24	12	561,5	437,5	418,5	1,313	0,905	0,446
rps8-rpl14	24	24	23	1083,5	669,5	335	1,598	0,921	0,640
rpl14	24	24	24	1031,5	501	320,5	1,919	0,907	0,595
rpl16ex2	24	23		869	460		1,644	1,048	0,000
rpl16in-1	24	24		1709	619,5		1,818	0,912	0,000
rpl16in-2	24	24	22	376	276,5	163,5	1,608	0,976	0,581
rpl16in-ex1	24	23	22	673	489	254,5	1,349	0,898	0,537
rps3-1	24	24	24	1293	630	387,5	1,628	0,906	0,469
rps3-2	21	23		1141	385		1,657	0,936	0,000
rpl22	24	22	24	711,5	446,5	249,5	1,480	0,996	0,598
rps19	23	24	24	1168	713,5	379	1,501	0,959	0,491
rps19-rpl2ex2	24	24	12	1451	542	271	1,723	0,902	0,660
rpl2ex2-in	24	23		1414,5	779		1,763	0,991	0,000
rpl2ex2-in-ex1	24	24	23	2803	1124	819	2,152	1,057	0,492
rpl2in-ex1	24	24	24	854	714,5	392	1,492	1,017	0,610

Anhang

Name	Anzahl der Replikate			Median(F635 Median – B635)			Median(<i>Median of Ratios</i> (635/532))		
	CP33A +Puro	CP33A -Puro	IgG -Puro	CP33A +Puro	CP33A -Puro	IgG -Puro	CP33A +Puro	CP33A -Puro	IgG -Puro
rpl2ex1	20	23	24	817	960	409	1,585	1,146	0,600
rpl23-I-CAU	24	24	24	1039,5	693,5	532	1,436	0,958	0,657
I-CAU-ycf2	24	24	24	929	821	659	0,882	0,719	0,495
ycf2-I-CAU	24	24	24	716	562	400,5	1,055	0,724	0,532
ycf2-1	24	24	24	838	735,5	520	1,172	1,015	0,604
ycf2-9	24	24	24	751,5	562,5	346,5	1,293	0,948	0,686
ycf2-3	24	24	24	766	597	410,5	1,107	0,956	0,611
ycf2-4	24	24	24	697,5	580,5	363	1,270	0,933	0,688
ycf2-5	24	24	24	724	519	302	1,483	1,059	0,725
ycf2-6	24	24	23	952	632,5	429	1,666	1,034	0,704
ycf2-7	24	24	24	1413,5	911	609	1,539	1,091	0,728
ycf2-8	24	24	24	674	589,5	300,5	1,249	0,935	0,633
ycf2-IG	24	24	24	588	421	251	1,492	1,089	0,710
IG-L-CAA	24	24	24	630,5	540,5	345	1,484	1,073	0,672
L-CAA	24	23	23	463,5	434	333	1,365	1,045	0,743
ndhBex2-1	21	24	23	713	598	338	1,409	0,980	0,564
ndhBex2-2	24	24	23	750	487	331	1,751	1,063	0,631
ndhBex2-in	24	24	22	636,5	459,5	369,5	2,018	1,013	0,721
ndhBex2-in-ex1	24	24	24	1197	749,5	522,5	1,702	1,009	0,756
ndhBin-ex1	21	24	24	350	309	208	1,661	1,039	0,743
ndhBex1-1	23	23	24	907	686	344,5	1,871	1,086	0,615
ndhBex1-2	24	24	24	1180	759,5	386,5	2,199	1,155	0,675
IG-rps7	24	23	24	709	439	302,5	1,511	0,962	0,649
rps7-rps12ex3	24	24	23	1225,5	771	370	1,718	0,956	0,668
rps12ex2	24	24	24	1127,5	576	511,5	1,955	1,144	0,830
rps12in1	24	24	24	1782	706,5	881	1,304	0,867	0,645
IG rps12-V-GAC-1	24	24	24	1289	626	467	1,938	1,020	0,779
IG rps12-V-GAC-2	24	23	24	765,5	591	410	1,422	1,035	0,769
IG rps12-V-GAC-3	23	24	24	832	610,5	418	1,567	1,079	0,719
IG rps12-V-GAC-4	24	24	24	1154	670	582	1,507	1,029	0,756
IG rps12-V-GAC-5	24	24	24	727,5	489	387,5	1,382	0,981	0,701
V-GAC	24	23	24	759,5	626	445,5	0,962	0,722	0,580
V-GAC-16S	24	24	24	2249,5	6432,5	4604,5	0,280	0,400	0,312
16S-1	24	24	24	6539,5	7756,5	5789,5	0,339	0,427	0,358
16S-2	24	24	23	1244	4167,5	2458	0,359	0,439	0,242
16S-3	24	24	12	6195	6676	5281	0,352	0,435	0,444
16S-4	23	24	24	1278	4064	1945,5	0,372	0,427	0,335
16S-5	24	24	24	1237,5	1711,5	1089,5	0,565	0,481	0,398
I-GAU ex1	24	24	24	1367	918	842,5	0,914	0,553	0,457
I-GAU ex1-in	23	23	24	1523	384	488,5	1,655	0,895	0,617
I-GAU ex2	24	24	24	1327	1105,5	1393	0,612	0,404	0,459
I-GAU-A-UGC	23	24	23	645	470,5	367	1,082	0,657	0,520
A-UGC ex1-in	22	23	24	748,5	374	545,5	1,136	0,753	0,625
A-UGC -in	23	24	24	693	414,5	364	1,704	0,994	0,640

Name	Anzahl der Replikate			Median(F635 Median – B635)			Median(<i>Median of Ratios</i> (635/532))		
	CP33A +Puro	CP33A -Puro	IgG -Puro	CP33A +Puro	CP33A -Puro	IgG -Puro	CP33A +Puro	CP33A -Puro	IgG -Puro
A-UGC ex1	24	24	12	1537,5	793,5	884,5	1,412	0,783	0,336
A-UGC-23S	23	24	24	2739	6325	6201	0,476	0,499	0,392
23S-1	24	24		3128	6547		0,263	0,461	0,000
23S-2	24	24	24	1415	3793,5	4845	0,338	0,485	0,336
23S-3	24	24	12	5134,5	5713,5	6759,5	0,328	0,489	0,497
23S-4	24	24	24	6068,5	7628,5	4260,5	0,336	0,486	0,331
23S-5	24	24	12	2737,5	1917,5	383	0,325	0,485	0,542
23S-6	21	24	24	539	2777,5	2028	0,392	0,469	0,395
23S-7	24	24	24	3140,5	4307	2953,5	0,392	0,480	0,353
23S-8	21	21	12	1151	1488	1881,5	0,220	0,429	0,513
23S-9	24	24	24	4133	6216,5	5244,5	0,266	0,391	0,349
4.5S	24	24	15	3349	3168	3543	0,318	0,352	0,192
R-ACG-1	24	23	24	2088,5	3081	2085	0,248	0,292	0,305
R-ACG-2	22	22	24	1114	859,5	469,5	1,089	0,794	0,489
N-GUU-1	24	24	24	532	549	347,5	0,699	0,476	0,315
IG-ycf1	24	24	24	1582	954	449	1,717	1,036	0,532
3'ndhF(ycf1)	24	24	23	1557,5	739	477	2,278	1,144	0,558
ndhF-3	24	23	12	1174	548	224,5	2,062	1,061	1,437
ndhF-4	23	24	12	1557	708	531,5	2,127	1,109	0,771
ndhF-5	24	24	24	1874,5	880	320,5	1,908	1,089	0,553
ndhF-IG	15	18	24	156	146,5	482,5	1,207	0,814	0,631
IG ndhF-rpl32	17	18	12	196	159	86,5	1,406	0,853	0,430
rpl32	18	21	17	236,5	196	111	1,168	0,680	0,371
IG rpl32-ccsA	24	22	12	380	299,5	301,5	1,200	0,810	0,367
IG-ccsA	23	23	12	177	167	98,5	0,940	0,568	0,286
ccsA	24	24	24	1246	660	419	1,937	0,994	0,477
ccsA-ndhD	24	24	12	1430,5	574	248,5	1,603	0,942	0,817
ndhD-1	24	24	21	1243	553,5	332	2,258	1,091	0,566
ndhD-2	24	23	24	1410,5	560	428,5	3,174	1,189	0,653
ndhD-psaC	21	24	24	2144	968	412	3,257	1,092	0,500
psaC-ndhE	24	24	24	3769,5	1927,5	798,5	2,299	0,913	0,441
ndhE	24	24	24	1088	511,5	318,5	2,167	0,998	0,495
IG-ndhG	24	24	24	1333,5	726,5	346,5	1,947	1,034	0,472
ndhG-ndhI	24	23	23	1421	847	375	1,992	0,992	0,401
ndhI	23	24	24	1581	685	524,5	2,447	1,105	0,691
ndhI-ndhAex2	20	24	24	505	340,5	164	1,575	0,883	0,512
ndhAex2-in	24	24	23	1523	679	467	2,258	1,075	0,502
ndhAex2-in-ex1	24	24	24	2166	857	519,5	2,444	1,076	0,549
ndhAin-1	24	24	24	907,5	561,5	372,5	1,567	0,914	0,510
ndhAin-ex1	15	12	23	1164	381,5	256	2,073	0,995	0,437
ndhAex1-ndhH	24	24	24	2157,5	977,5	350,5	2,923	1,180	0,571
ndhH-1	24	24	24	1774,5	630	489,5	2,282	1,215	0,516
ndhH-2	20	24	21	415,5	342,5	185	1,647	0,962	0,534
rps15	23	24	21	864	477	366	1,633	0,936	0,439

Anhang

Name	Anzahl der Replikate			Median(F635 Median – B635)			Median(<i>Median of Ratios</i> (635/532))		
	CP33A +Puro	CP33A -Puro	IgG -Puro	CP33A +Puro	CP33A -Puro	IgG -Puro	CP33A +Puro	CP33A -Puro	IgG -Puro
rps15-IG	21	24	23	1036	505	295	1,915	0,983	0,498
ycfl-1	22	24	24	830	541,5	307,5	1,444	0,880	0,478
ycfl-3	24	24	24	1083,5	546	365,5	1,240	0,753	0,450
ycfl-4	24	24	24	1347	678,5	535,5	1,284	0,829	0,501
ycfl-5	24	24	23	800,5	476,5	301	1,323	0,840	0,488
ycfl-6	24	24	24	990,5	506	314,5	1,696	0,941	0,606
ycfl-8	24	24	24	1271	674,5	390	1,662	1,108	0,589
ycfl-9	24	24	24	1038,5	650,5	334	1,515	1,079	0,566
IG N-R	21	23	23	659	427	298	1,842	1,170	0,667
18S	24	24	24	1253,5	2195	1604,5	0,479	0,444	0,336

Tabelle 6: Wertetabelle der CP33B RIP-Chip-Analyse (gesamte Plastom) von Stromamaterial. Die grafische Darstellung der Daten (Median(*Median of Ratios* (635/532))) befindet sich in Abb. 8. Zur Anzahl der Replikate und der Normalisierung der Daten s. Legende der Tabelle 5. Dargestellt sind die Mittelwerte von jeweils drei RIP-Chip-Analysen (= max. 36 Replikate) von CP33B und der Kontrollen (Präimmenserum und *cp33b*-Mutante) sowie die differentielle Anreicherungen der CP33B-IPs gegenüber den Kontroll-IPs. Ein zweiseitiger, ungepaarter t-Test der Median(*Median of Ratios* (635/532)), wurde wie bei Schmitz-Linneweber et al. (2005) beschrieben, durchgeführt.

Name	Anzahl der Replikate		Median(F635 Median – B635)		Median(<i>Median of Ratios</i> (635/532))		Differentielle Anreicherung (CP33B/ Kontrolle)	p-Wert
	CP33B	Kontrolle	CP33B	Kontrolle	CP33B	Kontrolle		
H-psbA	36	36	3190	1577	0,865	0,270	3,208	0
psbA	36	35	16367,5	1594	19,294	0,260	74,094	3,069E-11
psbA-Kex2	36	36	2018,5	1106	8,619	0,276	31,186	4,395E-07
Kex2-matK	36	36	557,5	227	0,397	0,437	0,909	0,0005067
matK-1	35	36	466	212,5	1,449	0,596	2,433	1,731E-05
matK-2	35	32	630	246	0,738	0,856	0,862	0,002207
Kint	30	24	293,5	115,5	0,803	0,302	2,654	0,002778
Kint-Kex1	36	25	341	124	1,396	0,467	2,988	8,277E-05
IG_K-rps16	35	36	245	276	1,507	0,807	1,867	1,443E-05
rps16ex2	35	36	205	281,5	1,006	0,417	2,410	3,636E-06
rps16ex2-in-ex1	30	30	259	141	1,884	1,179	1,597	0,001453
rps16in-1	27	22	112	174,5	0,570	0,108	5,301	0,492719
rps16in-2	36	30	149,5	193	0,963	0,601	1,601	5,526E-05
rps16ex2-IG	27	27	175	162	0,538	1,280	0,420	0,878736
Q	36	36	295,5	1377,5	0,051	0,302	0,167	0,254883
psbK	36	36	974	705,5	0,461	0,245	1,879	1,362E-05
psbI-S	36	36	388	372	0,219	0,282	0,776	7,392E-05
IG-psbI-G-1	36	36	758,5	3069	0,045	0,211	0,211	0,043689
IG-psbI-G-2	36	36	384	465,5	0,308	0,263	1,170	7,170E-05

Name	Anzahl der Replikate		Median(F635 Median – B635)		Median(Median of Ratios (635/532))		Differentielle Anreicherung (CP33B/Kontrolle)	p-Wert
	CP33B	Kontrolle	CP33B	Kontrolle	CP33B	Kontrolle		
Gex1-in	36	36	1507,5	429	0,456	0,286	1,592	2,579E-05
in-Gex2	36	36	529	973,5	0,267	0,255	1,047	6,850E-05
Gex2-R	36	36	478	436	0,594	0,281	2,115	3,159E-05
atpA-1	35	28	604	177,5	0,610	0,805	0,758	0,000372
atpA-3	36	36	547	262	1,923	0,651	2,954	6,354E-06
atpA-atpFex2	36	36	897,5	234,5	2,102	0,587	3,580	1,328E-05
atpFex2-in	36	36	1871	501,5	2,322	0,395	5,881	9,880E-06
atpFex2-in-ex1	36	36	1635,5	798	1,525	0,267	5,709	1,671E-05
atpFin-ex1	36	36	1100,5	486,5	1,756	0,360	4,883	8,690E-06
atpFex1-IG	36	36	3089	755	3,223	0,308	10,455	9,624E-07
atpH	36	33	728,5	230	1,741	0,685	2,539	1,259E-05
atpH-IG	36	36	4978,50	825,50	4,726	0,255	18,566	7,12E-09
IG-atpI	32	36	438,50	277,50	2,133	0,481	4,433	2,44E-05
atpI	36	33	640,50	240,00	3,115	0,672	4,635	1,08E-07
atpI-rps2	36	36	1304,50	597,00	2,435	0,372	6,544	2,73E-07
rps2	36	24	133,50	118,50	0,411	0,564	0,728	5,25E-02
rps2-IG	36	21	303,00	153,00	1,862	0,067	27,701	5,13E-06
rpoC2-1	27	24	203,00	132,00	1,515	0,768	1,973	3,40E-01
rpoC2-3	36	27	372,00	145,00	3,159	0,632	5,000	3,89E-07
rpoC2-4	36	20	277,00	183,50	1,831	0,048	38,241	2,04E-05
rpoC2-5	30	21	108,50	125,00	0,687	0,059	11,684	4,87E-01
rpoC2-6	27	24	166,00	116,50	1,357	0,432	3,143	6,35E-03
rpoC2-7	24	24	417,50	186,50	1,151	0,366	3,141	9,36E-03
rpoC2-rpoC1-1	21	25	406,00	305,00	0,111	0,480	0,231	1,70E-02
rpoC1ex1-1	36	27	229,00	145,00	1,510	0,810	1,865	5,74E-05
rpoC1ex1-in	36	24	156,50	135,50	1,639	0,405	4,048	6,73E-04
rpoC1ex1-in-ex2	36	24	199,00	115,50	1,362	0,185	7,370	4,72E-05
rpoC1in	36	32	223,00	170,50	1,869	0,911	2,053	3,17E-06
rpoC1in-ex2	29	27	120,00	196,00	2,772	0,889	3,119	1,30E-03
rpoC1-rpoB-1	30	27	140,00	122,00	1,576	1,018	1,548	8,56E-03
rpoC1-rpoB-2	36	30	178,50	170,00	1,064	0,605	1,759	1,06E-04
rpoB-1	36	36	299,00	193,00	1,573	0,918	1,713	2,91E-05
rpoB-2	27	23	104,00	199,00	1,600	0,141	11,338	1,21E-01
rpoB-3	30	24	152,50	223,00	0,844	0,516	1,636	5,45E-01
rpoB-4	36	36	212,00	291,00	2,820	1,204	2,343	0,402417
rpoB-IG	24	27	145,50	151,00	0,730	1,567	0,466	2,84E-01
IG rpoB-C	36	27	268,50	240,00	2,306	1,082	2,131	2,38E-05
IG-C	36	36	282,50	1079,00	0,072	0,281	0,254	5,64E-02
C-IG	36	36	115,50	228,00	0,628	0,375	1,675	6,08E-05
IG-petN	36	36	289,00	606,50	0,380	0,280	1,357	5,95E-05
petN-IG	36	36	97,50	223,00	0,624	0,491	1,269	4,37E-05
psbM	24	20	66,50	96,50	0,208	0,087	2,398	9,44E-01
IG psbM-D-1	36	36	155,00	212,50	0,413	0,380	1,088	1,17E-04

Anhang

Name	Anzahl der Replikate		Median(F635 Median – B635)		Median(Median of Ratios (635/532))		Differentielle Anreicherung (CP33B/Kontrolle)	p-Wert
	CP33B	Kontrolle	CP33B	Kontrolle	CP33B	Kontrolle		
IG psbM-D-2	36	34	150,50	137,50	0,769	0,832	0,924	8,42E-03
D	36	33	125,50	394,00	0,174	0,329	0,527	4,31E-02
Y	35	36	186	191,5	0,575	0,425	1,353	6,80E-05
E	36	36	184,00	628,00	0,468	0,329	1,420	2,33E-04
IG E-T	27	24	76,00	161,00	1,345	0,759	1,771	9,18E-02
T	36	36	236,50	223,50	0,233	0,453	0,514	3,84E-03
IG T-psbD-1	36	36	716,50	251,50	1,456	0,482	3,019	3,20E-06
IG T-psbD-2	36	36	1296,50	794,00	1,761	0,219	8,032	1,89E-04
psbD-1	36	36	3488,50	792,00	4,011	0,324	12,370	6,91E-09
psbD-2	36	36	1588,00	575,50	3,302	0,402	8,224	8,32E-09
psbD-psbC	36	36	664,00	263,00	2,346	0,396	5,928	2,40E-07
psbC-1	36	36	1159,00	524,00	1,602	0,271	5,903	3,74E-07
psbC-2	36	36	2733,00	700,50	2,599	0,263	9,885	2,53E-07
psbC-S	36	36	1029,00	628,50	1,227	0,279	4,398	5,46E-07
S-psbZ	36	36	1680,00	439,00	2,194	0,339	6,480	1,48E-06
IG psbZ-G	36	36	507,00	397,00	0,313	0,318	0,982	2,84E-05
G-fM	36	36	330,00	368,00	0,174	0,370	0,471	4,14E-02
fm-rps14	36	36	473,00	859,00	0,144	0,302	0,476	1,70E-02
rps14-psaB-1	36	36	2418,50	554,50	1,092	0,283	3,856	1,03E-06
rps14-psaB-2	36	36	1299,00	477,50	0,950	0,318	2,992	5,42E-06
psaB-1	36	36	6021,00	1631,50	2,372	0,294	8,066	9,77E-08
psaB-2	36	36	756,50	322,50	1,262	0,412	3,059	7,26E-06
psaB-psaA-1	36	36	869,50	319,00	1,917	0,590	3,250	3,01E-06
psaB-psaA-2	36	27	817,00	244,00	1,588	0,324	4,898	2,85E-06
psaA-1	36	36	4091,00	981,00	1,744	0,318	5,477	1,43E-06
psaA-2	35	32	538,00	236,50	1,332	0,653	2,041	3,04E-06
psaA-3	36	36	2702,50	704,00	2,101	0,303	6,929	1,98E-06
psaA-IG-1	36	36	2721,50	676,00	1,569	0,313	5,006	2,94E-07
psaA-IG-2	27	24	335,00	183,50	1,992	0,617	3,231	3,61E-04
IG-ycf3ex3	36	36	511,50	237,50	1,096	1,494	0,733	5,31E-02
ycf3ex3-in2	24	33	446,50	193,00	1,084	1,240	0,874	4,82E-03
ycf3ex3-in2-ex2	36	36	263,00	174,00	0,821	0,563	1,459	1,38E-04
ycf3in2	33	27	210,00	170,00	1,977	0,801	2,467	3,04E-04
ycf3ex2	36	27	240,00	174,00	2,298	0,855	2,687	1,97E-07
ycf3ex1	36	33	307,00	224,00	0,775	0,764	1,013	1,29E-03
S-GGA	36	36	192,00	779,00	0,067	0,248	0,268	7,77E-01
rps4-1	32	23	336,00	136,00	0,916	0,074	12,385	1,04E-03
rps4-2	32	33	191,50	178,00	0,979	1,047	0,935	7,35E-02
T-UGU	35	36	165,00	204,00	0,450	0,555	0,810	9,20E-04
T-IG	36	36	177,50	563,00	0,058	0,232	0,250	6,22E-01
L-UAA ex1-in	36	36	525,50	1798,00	0,151	0,279	0,540	8,84E-03
L-UAA in-ex2	36	36	304,50	1270,00	0,126	0,231	0,543	2,34E-01
L-UAA ex2-IG	36	36	423,00	880,00	0,172	0,264	0,650	2,31E-03

Name	Anzahl der Replikate		Median(F635 Median – B635)		Median(Median of Ratios (635/532))		Differentielle Anreicherung (CP33B/Kontrolle)	p-Wert
	CP33B	Kontrolle	CP33B	Kontrolle	CP33B	Kontrolle		
F-GAA-1	36	36	221,00	749,00	0,072	0,249	0,287	7,50E-01
F-GAA-2	36	36	293,50	694,00	0,159	0,299	0,532	1,48E-02
ndhJ	36	36	309,50	219,50	1,228	0,481	2,551	1,39E-04
ndhJ-ndhK	36	36	453,50	226,00	2,117	0,584	3,625	3,00E-05
ndhK	36	30	248,50	203,50	3,110	0,345	9,008	1,76E-07
ndhK-ndhC	36	36	578,50	245,00	3,102	0,399	7,774	6,48E-07
ndhC-IG	36	36	1974,00	354,50	3,499	0,318	11,018	9,02E-07
IG ndhC-V-UAA	36	24	284,50	163,00	1,070	0,420	2,548	1,20E-03
Vex2-in	35	27	201,00	334,00	0,684	0,234	2,929	1,53E-05
Vin-ex1	36	36	214,50	181,50	0,142	0,349	0,405	9,51E-03
Vex1-atpE	36	36	215,00	159,50	0,098	0,458	0,213	1,94E-01
atpE-atpB	35	36	300,00	173,50	0,397	0,459	0,864	4,29E-04
atpB-1	35	36	709,00	337,00	0,465	0,490	0,950	1,69E-04
atpB-2	36	36	425,00	159,00	0,922	0,715	1,289	6,42E-05
atpB-3	36	36	694,50	244,00	0,693	0,764	0,907	3,19E-04
atpB-rbcL	36	36	661,50	236,00	0,462	0,386	1,197	9,39E-05
rbcL-1	36	36	3466,00	563,50	1,005	0,399	2,519	3,86E-06
rbcL-2	36	36	1346,50	193,50	0,971	0,398	2,437	3,42E-06
rbcL-3	36	36	2964,50	400,50	1,367	0,442	3,093	7,03E-07
IG rbcL-accD	36	36	346,50	167,00	0,455	0,512	0,887	2,79E-04
accD-1	31	34	292,00	147,50	0,921	0,688	1,339	2,25E-03
accD-2	36	36	431,00	206,00	1,122	0,616	1,822	7,02E-05
accD-3	36	33	249,50	167,00	0,899	0,647	1,390	9,06E-05
IG accD-psaI	36	36	202,00	603,50	0,271	0,239	1,134	1,84E-04
psaI	36	36	376,50	492,00	1,481	0,203	7,286	4,07E-06
ycf4-1	36	34	1047,50	911,00	1,182	0,294	4,020	7,82E-06
ycf4-2	36	33	365,50	243,00	0,735	0,247	2,974	1,57E-04
cemA-1	36	33	500,50	184,00	1,108	0,657	1,686	1,42E-04
cemA-2	36	36	601,50	333,00	0,995	0,392	2,536	2,07E-05
cemA-3	36	36	667,50	237,00	0,843	0,520	1,621	2,22E-05
petA-1	36	32	279,50	215,50	0,680	0,260	2,609	3,14E-05
petA-2	36	36	980,50	322,00	0,701	0,546	1,284	2,64E-05
petA-3	36	36	339,50	374,00	0,590	0,593	0,994	4,44E-04
IG petA-psbJ	36	33	340,50	167,00	0,470	0,475	0,989	1,02E-04
psbJLF	36	36	1080,50	270,50	0,217	0,398	0,545	2,27E-03
psbFE	36	36	1333,50	738,50	0,382	0,251	1,519	3,84E-05
IG psbE-petL-1	36	36	748,00	459,50	0,331	0,281	1,178	6,49E-05
IG psbE-petL-2	36	36	185,00	240,50	0,732	0,259	2,829	3,77E-05
IG psbE-petL-3	36	36	220,50	174,00	0,602	0,448	1,343	9,66E-05

Anhang

Name	Anzahl der Replikate		Median(F635 Median – B635)		Median(Median of Ratios (635/532))		Differentielle Anreicherung (CP33B/Kontrolle)	p-Wert
	CP33B	Kontrolle	CP33B	Kontrolle	CP33B	Kontrolle		
petL	36	36	461,00	250,00	0,374	0,454	0,822	2,18E-04
petG-W-CCA	36	36	257,00	324,00	0,257	0,291	0,883	1,22E-03
P-UGG	36	36	252,00	292,50	0,079	0,421	0,187	6,64E-01
psaJ	35	36	481,00	213,00	0,113	0,381	0,296	7,18E-03
IG psaJ-rpl33	36	36	614,00	255,00	0,439	0,378	1,161	6,31E-05
rpl33	36	36	304,50	182,50	0,643	0,632	1,017	1,33E-04
rpl33-rps18	36	36	633,00	264,50	0,622	0,504	1,234	4,01E-05
rps18	35	35	334,00	307,00	0,785	0,279	2,815	1,74E-04
rpl20	32	32	240,50	217,50	0,529	0,249	2,126	1,81E-03
rpl20-IG	33	35	219,00	205,00	0,652	0,405	1,610	3,08E-03
in1-rps12ex1	33	36	340,00	365,00	0,736	0,271	2,713	5,35E-03
rps12ex1-clpPex3	36	36	430,00	201,00	0,626	0,390	1,605	4,71E-05
clpPex3-in2	35	36	337,00	218,50	0,464	0,732	0,634	1,32E-03
in2-clpPex2	36	35	247,00	164,00	0,598	0,774	0,771	1,29E-03
clpPex2-in1	36	36	329,50	206,50	0,484	0,753	0,642	1,54E-03
clpPin1	36	36	481,50	301,50	0,476	0,362	1,313	1,02E-04
clpPex1	36	36	795,00	399,00	1,173	0,241	4,866	8,70E-06
psbB-1	36	36	2973,50	621,50	2,113	0,270	7,835	8,47E-08
psbB-2	36	36	776,50	349,00	0,772	0,278	2,775	9,15E-06
psbBTN	36	36	719,50	395,00	0,939	0,364	2,580	1,04E-05
psbNH	36	36	689,00	193,50	0,246	0,423	0,582	9,66E-04
psbH-petBex1-in	36	36	759,50	257,00	0,992	0,368	2,695	3,43E-05
petBin	36	36	1261,00	365,00	1,644	0,453	3,630	3,94E-06
petBin-ex2	36	36	3344,50	450,00	2,563	0,236	10,856	1,37E-07
petBex2	36	36	1196,00	192,00	1,534	0,528	2,907	2,85E-06
petBex2-petDex1-in	36	36	1606,50	360,00	0,984	0,447	2,201	3,69E-06
petDin	36	36	969,50	279,00	0,753	0,317	2,378	6,84E-06
petDex2	36	36	1075,00	308,50	1,730	0,309	5,597	4,56E-08
petD-rpoA	36	36	263,50	303,00	0,473	0,434	1,089	4,78E-05
rpoA	36	36	340,50	203,00	0,571	0,349	1,633	1,18E-06
rpoA-rps11	33	34	300,00	178,50	0,605	0,528	1,145	2,94E-03
rps11-rpl36	36	24	441,50	254,50	0,948	0,141	6,718	5,56E-06
IG rpl36-rps8	36	34	280,50	181,50	0,848	0,522	1,625	7,06E-04
rps8	33	27	323,00	187,00	0,684	0,445	1,536	3,29E-04
rps8-rpl14	36	36	537,00	269,00	0,810	0,409	1,980	2,64E-04
rpl14	36	36	570,00	282,50	1,064	0,410	2,594	3,83E-05
rpl16ex2	36	35	394,00	449,00	0,977	0,333	2,936	4,92E-05
rpl16in-1	35	36	900,00	415,00	0,960	0,213	4,517	8,25E-05

Name	Anzahl der Replikate		Median(F635 Median – B635)		Median(<i>Median of Ratios</i> (635/532))		Differentielle Anreicherung (CP33B/ Kontrolle)	p-Wert
	CP33B	Kontrolle	CP33B	Kontrolle	CP33B	Kontrolle		
rpl16in-2	24	24	160,00	291,00	0,926	0,143	6,485	3,89E-05
rpl16in-ex1	36	33	459,50	317,00	1,122	0,252	4,452	8,75E-05
rps3-1	33	35	466,00	397,00	0,848	0,186	4,547	1,14E-03
rps3-2	35	33	381,00	266,00	0,937	0,260	3,598	2,43E-04
rpl22	36	36	384,50	237,00	1,103	0,261	4,222	4,60E-05
rps19	35	36	1047,00	335,00	0,948	0,297	3,188	2,19E-04
rps19-rpl2ex2	36	36	1190,00	316,50	1,984	0,272	7,288	7,44E-07
rpl2ex2-in	36	36	826,50	494,00	2,017	0,249	8,112	2,83E-06
rpl2ex2-in-ex1	36	36	1274,00	360,50	3,107	0,480	6,465	2,21E-07
rpl2in-ex1	36	36	526,00	871,00	0,577	0,299	1,928	1,80E-07
rpl2ex1	36	36	701,00	301,50	1,733	0,392	4,418	3,96E-06
rpl23-I-CAU	36	34	604,50	214,00	1,796	0,907	1,980	1,79E-05
I-CAU-ycf2	36	36	334,50	319,00	0,138	0,418	0,330	7,06E-01
ycf2-I-CAU	36	36	258,00	410,00	0,176	0,302	0,582	5,31E-02
ycf2-1	36	26	306,00	185,50	0,938	0,863	1,087	3,12E-04
ycf2-9	36	28	307,00	174,00	1,810	0,613	2,952	5,10E-06
ycf2-3	33	29	202,00	166,00	1,238	0,758	1,634	9,92E-04
ycf2-4	36	30	313,50	190,50	1,138	0,441	2,579	8,36E-06
ycf2-5	34	29	217,50	162,00	1,276	0,758	1,684	6,67E-04
ycf2-6	36	31	389,50	214,00	1,944	0,664	2,929	2,81E-06
ycf2-7	36	32	359,50	286,50	0,984	0,592	1,661	1,16E-03
ycf2-8	36	33	321,00	204,00	0,573	0,702	0,816	7,77E-04
ycf2-IG	36	31	211,00	262,00	0,698	0,255	2,733	1,03E-04
IG-L-CAA	36	30	208,50	217,00	0,812	0,308	2,632	4,12E-05
L-CAA	33	30	191,00	268,00	0,570	0,267	2,134	1,67E-03
ndhBex2-1	36	36	280,50	295,50	0,760	0,407	1,869	2,76E-04
ndhBex2-2	36	33	219,50	199,00	0,846	0,304	2,782	5,34E-05
ndhBex2-in	36	33	358,50	365,00	1,226	0,277	4,423	2,16E-05
ndhBex2-in-ex1	36	36	408,50	322,50	1,274	0,486	2,619	2,61E-05
ndhBin-ex1	33	27	218,00	185,00	0,864	0,370	2,338	1,34E-04
ndhBex1-1	36	36	540,00	228,50	1,405	0,625	2,248	6,13E-06
ndhBex1-2	36	36	896,00	451,00	1,338	0,328	4,074	1,53E-06
IG-rps7	36	30	267,50	199,50	0,573	0,354	1,620	4,69E-04
rps7-rps12ex3	36	36	677,50	258,00	0,819	0,307	2,662	2,51E-08
rps12in2-ex2	36	36	546,50	347,50	1,649	0,703	2,345	6,40E-06
rps12ex2	36	36	592,50	402,00	0,917	0,523	1,751	4,01E-05
rps12in1	36	36	735,00	377,50	0,892	0,429	2,078	5,62E-06
IG rps12-V-GAC-1	36	31	554,00	292,00	3,056	0,902	3,388	1,05E-06
IG rps12-V-GAC-2	35	33	275,00	209,00	2,300	1,042	2,208	3,20E-05

Anhang

Name	Anzahl der Replikate		Median(F635 Median – B635)		Median(Median of Ratios (635/532))		Differentielle Anreicherung (CP33B/ Kontrolle)	p-Wert
	CP33B	Kontrolle	CP33B	Kontrolle	CP33B	Kontrolle		
IG rps12-V-GAC-3	36	28	383,50	223,50	2,042	0,858	2,380	6,16E-06
IG rps12-V-GAC-4	33	33	344,00	271,00	1,925	0,827	2,329	3,51E-01
IG rps12-V-GAC-5	35	29	328,00	196,00	1,553	0,729	2,130	6,67E-06
V-GAC	36	36	537,50	553,00	0,342	0,329	1,037	2,71E-04
V-GAC-16S	36	36	2212,00	4713,50	0,098	0,310	0,316	2,39E-02
16S-1	36	36	2963,00	8207,50	0,093	0,289	0,320	3,32E-02
16S-2	36	36	1348,50	6425,00	0,096	0,290	0,330	1,20E-01
16S-3	36	36	2136,00	5014,50	0,083	0,316	0,263	1,09E-01
16S-4	36	36	1476,50	5969,50	0,079	0,268	0,293	3,33E-01
16S-5	36	36	1083,50	3465,00	0,215	0,276	0,779	1,32E-04
I-GAU ex1	36	36	3502,00	2017,50	0,620	0,290	2,139	2,26E-07
I-GAU ex1-in	24	36	5889,00	742,50	3,194	0,357	8,945	6,83E-05
I-GAU ex2	36	36	2560,00	1518,50	0,970	0,281	3,457	1,34E-08
I-GAU-A-UGC	36	36	998,00	441,00	0,314	0,370	0,850	1,64E-05
A-UGC ex1-in	36	36	945,00	493,00	0,574	0,368	1,560	2,41E-06
A-UGC -in	36	36	1633,50	679,00	0,588	0,414	1,420	4,49E-06
A-UGC ex1	36	36	758,00	758,50	0,451	0,324	1,391	1,36E-06
A-UGC-23S	36	36	3720,50	5430,50	0,163	0,220	0,738	2,17E-03
23S-1	36	36	3243,50	4659,50	0,168	0,203	0,826	2,51E-03
23S-2	36	36	1120,50	3422,50	0,148	0,221	0,668	3,74E-03
23S-3	36	36	4304,50	5952,50	0,177	0,239	0,742	1,15E-03
23S-4	36	36	6439,50	5297,50	0,191	0,202	0,943	1,96E-03
23S-5	36	36	3101,00	5286,50	0,157	0,230	0,680	5,45E-03
23S-6	36	36	1986,00	4687,00	0,163	0,253	0,643	3,88E-03
23S-7	36	36	5390,50	6741,50	0,175	0,240	0,728	2,06E-03
23S-8	36	36	2651,00	1936,00	0,193	0,236	0,816	1,44E-03
23S-9	36	36	1044,00	5233,00	0,058	0,203	0,283	2,54E-01
4,5S	36	36	772,50	4172,50	0,079	0,237	0,331	2,34E-01
R-ACG-1	36	36	506,00	1554,50	0,283	0,280	1,012	1,63E-04
R-ACG-2	36	35	377,00	381,00	1,711	0,338	5,067	1,12E-06
N-GUU-1	35	36	246,00	395,00	0,634	0,301	2,108	1,12E-04
IG-ycf1	36	36	656,50	1054,50	0,170	0,311	0,547	1,85E-03
3'ndhF(ycf1)	36	36	486,50	421,00	1,431	0,503	2,843	3,15E-06
ndhF-1	36	36	717,50	272,50	1,192	0,315	3,783	4,42E-06
ndhF-2	36	36	565,50	293,50	0,804	0,359	2,240	3,83E-05
ndhF-3	36	36	469,00	245,00	1,190	0,322	3,699	1,29E-05
ndhF-4	36	36	742,50	433,50	2,312	0,540	4,281	2,29E-07
ndhF-5	36	36	509,50	544,00	0,902	0,280	3,223	8,99E-07

Name	Anzahl der Replikate		Median(F635 Median – B635)		Median(Median of Ratios (635/532))		Differentielle Anreicherung (CP33B/Kontrolle)	p-Wert
	CP33B	Kontrolle	CP33B	Kontrolle	CP33B	Kontrolle		
ndhF-IG	36	36	97,50	156,50	0,596	0,320	1,861	9,55E-05
IG ndhF-rpl32	33	30	44,00	65,00	0,341	0,319	1,068	3,54E-03
rpl32	36	33	92,50	186,00	0,132	0,197	0,669	7,42E-04
IG rpl32-ccsA	27	20	91,00	123,00	1,933	0,044	44,254	1,09E-02
IG-ccsA	33	33	75,00	125,00	0,750	0,405	1,852	0,002655
ccsA	36	36	1233,50	465,00	3,948	0,356	11,084	7,67E-09
ccsA-ndhD	33	24	243,00	143,00	2,977	0,265	11,215	1,88E-06
ndhD-1	36	36	264,00	261,50	1,167	0,482	2,419	1,46E-05
ndhD-2	36	26	243,50	216,00	1,445	0,541	2,670	2,20E-06
ndhD-psaC	36	36	865,00	470,50	1,625	0,324	5,012	3,71E-08
psaC-ndhE	36	36	1177,50	1414,00	0,575	0,265	2,166	7,79E-06
ndhE	24	36	1353,50	324,00	1,537	0,306	5,027	2,85E-04
IG-ndhG	36	36	331,50	375,00	0,545	0,238	2,291	1,15E-04
ndhG	36	36	551,00	507,50	0,977	0,361	2,705	4,50E-06
ndhG-ndhI	36	36	568,00	428,50	0,792	0,235	3,367	6,72E-06
ndhI	36	36	459,50	239,00	1,432	0,444	3,221	1,55E-06
ndhI-ndhAex2	36	36	287,50	243,50	1,608	0,537	2,995	5,41E-06
ndhAex2-in	36	36	380,50	260,50	1,716	0,460	3,727	1,73E-06
ndhAex2-in-ex1	36	35	623,50	319,00	0,644	0,445	1,445	7,20E-05
ndhAin-1	36	34	315,00	265,00	0,876	0,490	1,788	5,30E-05
ndhAin-2	36	36	256,50	215,00	0,819	0,472	1,735	1,45E-04
ndhAin-ex1	36	36	294,50	227,50	1,699	0,541	3,140	4,24E-06
ndhAex1-ndhH	36	36	503,50	389,50	1,389	0,396	3,511	1,17E-05
ndhH-1	36	26	311,00	157,50	2,744	0,665	4,124	5,40E-06
ndhH-2	36	33	199,00	234,00	2,718	0,959	2,833	2,31E-06
rps15	36	33	270,50	183,00	2,064	0,937	2,202	1,06E-05
rps15-IG	36	27	400,00	210,00	3,989	0,961	4,151	5,80E-08
yef1-1	36	36	587,50	1639,50	0,713	0,281	2,541	5,38E-05
yef1-2	36	36	422,50	5582,00	0,555	0,296	1,877	5,94E-05
yef1-3	36	33	185,50	229,00	1,848	0,679	2,723	2,00E-04
yef1-4	33	30	289,00	235,00	2,451	1,128	2,173	4,53E-05
yef1-5	35	30	221,00	205,50	2,700	1,279	2,110	4,43E-04
yef1-6	36	31	241,50	194,00	3,075	1,181	2,604	1,83E-05
yef1-7	36	36	416,50	261,50	1,200	0,604	1,986	1,10E-05
yef1-8	36	31	262,50	190,00	1,167	0,598	1,950	1,49E-04
yef1-9	36	36	378,50	297,00	0,870	0,475	1,832	3,99E-05
N-GUU-2	36	36	401,50	638,50	0,179	0,307	0,582	6,05E-02
IG N-R	36	36	335,50	298,00	1,072	0,736	1,457	5,85E-05

Anhang

Tabelle 7: Wertetabelle der CP33B RIP-Chip-Analyse (gesamte Plastom) von plastidären Membranen. Die grafische Darstellung der Daten (*Median of Ratios* (635/532)) von CP33B und Kontrolle (= *cp33b*-Mutante) sowie die daraus ermittelte differentielle Anreicherung der CP33B-IP gegenüber der Kontroll-IP, befinden sich in Abb. 25 A+B. Zur Anzahl der Replikate und der Normalisierung der Daten s. Legende der Tabelle 5. Dargestellt sind Daten von jeweils einer RIP-Chip-Analyse (= max. 12 Replikate) von CP33B und der Kontrolle.

Name	Anzahl der Replikate		Median(F635 Median - B635)		Median(F532 Median - B532)		Median(<i>Median of Ratios</i> (635/532))		Different. Anreicherg.
	CP33B	Kontrolle	CP33B	Kontrolle	CP33B	Kontrolle	CP33B	Kontrolle	(CP33B/ Kontrolle)
H-psbA	12	12	337,5	64	1576	977	0,3045	0,0655	4,64885496
psbA	12	12	7840	440,5	4457,5	5758	2,3667	0,068	34,8044118
psbA-Kex2	12	12	691	135	864	979,5	0,9863	0,13	7,58692308
Kex2-matK	12	12	268	165	836,5	628,5	0,5026	0,277	1,81444043
matK-1	12	12	474	194,5	1170,5	648,5	0,5852	0,3405	1,71864905
matK-2	12	12	1175,5	658	1643,5	1407,5	1,0892	0,4695	2,3199148
Kint	12	12	608	275	1036,5	670,5	0,8155	0,3675	2,21904762
Kint-Kex1	12	12	309,5	189,5	597,5	506	0,6818	0,3815	1,78715596
IG_K-rps16	12	12	757,5	312	1451,5	799,5	0,8372	0,4115	2,0345079
rps16ex2	12	12	1482	624	1752,5	1322	1,1431	0,4855	2,35447992
rps16ex2-in-ex1	12	12	488	301	1044,5	761	0,6769	0,397	1,70503778
rps16in-1	12	12	581,5	307,5	1048,5	697	0,9583	0,4455	2,15106622
rps16in-2	12	12	420	235	712,5	474	0,8218	0,412	1,99466019
rps16ex2-IG	12	12	799,5	529	1419	1344,5	0,7427	0,4125	1,80048485
Q	12	12	765	180	7077	2449	0,1526	0,089	1,71460674
psbI-S	12	12	464,5	284	1477	1394	0,4249	0,1765	2,40736544
IG-psbI-G-1	12	12	606,5	419	16009,5	14259	0,0546	0,031	1,76129032
IG-psbI-G-2	12	12	580,5	270	2110	1676,5	0,3409	0,152	2,24276316
Gex1-in	12	12	1657	385,5	5869	3894	0,3486	0,098	3,55714286
in-Gex2	12	12	877,5	306,5	3558	2900	0,3059	0,117	2,61452991
Gex2-R	12	12	1039,5	263,5	2145,5	1063	0,7014	0,2405	2,91642412
atpA-1	12	12	795,5	408	1168	840,5	0,9646	0,4375	2,2048
atpA-3	12	12	315,5	124,5	573	383	0,8008	0,296	2,70540541
atpA-atpFex2	12	12	381	153	645,5	646	0,8015	0,284	2,8221831
atpFex2-in	11	12	968	317,5	1548	1205	1,0262	0,2915	3,52041166
atpFex2-in-ex1	12	12	1281	647,5	2410	2201,5	0,707	0,2725	2,59449541
atpFin-ex1	12	12	517	231,5	989	782	0,7371	0,2995	2,46110184
atpFex1-IG	11	12	1276	610,5	1902	2310,5	0,8652	0,272	3,18088235
atpH	12	12	423	231,5	882,5	743,5	0,8113	0,3215	2,52348367
atpH-IG	12	12	5250,5	1830	6638	8399	1,1746	0,229	5,12925764
IG-atpI	12	12	626	381,5	1084,5	1240,5	0,7973	0,339	2,3519174
atpI	12	12	774,5	299,5	1248	954	0,8526	0,3045	2,8
atpI-rps2	12	12	1368,5	680,5	2089	2330	0,8645	0,3	2,88166667
rps2	12	12	811	420,5	1651	1088,5	0,7665	0,38	2,01710526
rps2-IG	11	12	399	295	859	768,5	0,5698	0,377	1,51140584
rpoC2-1	12	12	663	367,5	1239,5	1036	0,6958	0,36	1,93277778
rpoC2-2	10	12	552	317	1298	810	0,5502	0,352	1,56306818
rpoC2-3	12	9	665	109	1650,5	274	0,5761	0,396	1,45479798
rpoC2-4	12	12	583	365	1585	980	0,5131	0,3695	1,38863329
rpoC2-5	12	12	435	280	1038	804	0,56	0,3745	1,4953271
rpoC2-6	12	12	692	384,5	1752,5	1123	0,511	0,3445	1,48330914
rpoC2-rpoC1-2	12	12	321	237,5	820	621,5	0,5082	0,3835	1,32516297
rpoC1ex1-1	12	12	605,5	372	1645	1042,5	0,5278	0,362	1,45801105
rpoC1ex1-2	12	12	350,5	278	1093,5	833,5	0,4179	0,3325	1,25684211
rpoC1ex1-in	12	12	328,5	191	873	564,5	0,5803	0,3625	1,60082759

Name	Anzahl der Replikate		Median(F635 Median - B635)		Median(F532 Median - B532)		Median(Median of Ratios (635/532))		Different. Anreicherg.
	CP33B	Kontrolle	CP33B	Kontrolle	CP33B	Kontrolle	CP33B	Kontrolle	(CP33B/ Kontrolle)
rpoC1ex1-in-ex2	12	12	555,5	353	1454	937,5	0,5397	0,369	1,46260163
rpoC1in	12	12	486	321,5	1294,5	885,5	0,518	0,3615	1,4329184
rpoC1in-ex2	12	12	551,5	375	1348,5	991,5	0,6062	0,4045	1,4986403
rpoC1-rpoB-1	12	12	741	594,5	1960,5	1337	0,5579	0,4245	1,31425206
rpoC1-rpoB-2	12	12	1143,5	612,5	2637,5	1645	0,5992	0,371	1,61509434
rpoB-1	12	12	297	294,5	1306	887	0,3346	0,315	1,06222222
rpoB-2	12	12	147	140	454	467,5	0,5264	0,3355	1,56900149
rpoB-3	12	12	1100	566,5	1925	1180	0,8379	0,4415	1,89784824
rpoB-4	12	12	437	231	1035	577,5	0,5558	0,429	1,2955711
rpoB-IG	12	12	578	433,5	1195	952,5	0,6741	0,4415	1,52684032
IG rpoB-C	12	12	622	492	1253,5	1271	0,6566	0,4295	1,52875437
IG-C	12	12	609,5	375,5	4520	3696	0,1813	0,095	1,90842105
C-IG	12	12	111	131	374	383	0,4508	0,3775	1,19417219
IG-petN	12	12	510	264,5	1517,5	1083	0,4802	0,257	1,86848249
petN-IG	12	12	92,5	83	255,5	279,5	0,5782	0,325	1,77907692
psbM	12	12	218	106	477,5	309	0,63	0,3565	1,76718093
IG psbM-D-1	12	12	338	219	829,5	574,5	0,5537	0,339	1,63333333
IG psbM-D-2	12	12	501	287	1017,5	541,5	0,7224	0,4405	1,6399546
D	12	12	258,5	156,5	1094,5	1262,5	0,2814	0,1625	1,73169231
Y	12	12	330	146	644	436	0,6489	0,3145	2,06327504
E	12	12	825,5	464,5	1839	1423	0,7644	0,344	2,22209302
IG E-T	12	12	691	421	1399,5	923,5	0,8162	0,4505	1,81176471
T	12	12	338	235,5	941,5	982,5	0,5201	0,246	2,11422764
IG T-psbD-1	12	11	788	504	1835,5	1808	0,6405	0,289	2,21626298
IG T-psbD-2	12	12	2057,5	403,5	2834	1580,5	0,9905	0,264	3,75189394
psbD-1	12	12	4160	596	3610,5	2070,5	1,6485	0,354	4,65677966
psbD-2	12	11	577	274	1242	1198	0,6895	0,228	3,02412281
psbD-psbC	12	12	426,5	197,5	767,5	807	0,7882	0,2515	3,13399602
psbC-1	12	12	434	243,5	1182,5	1291,5	0,4648	0,168	2,76666667
psbC-2	12	12	1431,5	422	2474,5	2403,5	0,7833	0,171	4,58070175
psbC-S	12	12	1057	504,5	2126	2261,5	0,6433	0,2055	3,13041363
S-psbZ	12	12	1756	791,5	2275	2184	0,9324	0,311	2,99807074
IG psbZ-G	12	12	1049,5	393	1567,5	1228,5	0,9597	0,343	2,79795918
G-fM	12	12	271,5	155,5	1072,5	933,5	0,2912	0,1405	2,07259786
fm-rps14	12	12	402	203	2645,5	2093	0,182	0,096	1,89583333
rps14-psaB-1	12	12	1349,5	898,5	3391	2760,5	0,5684	0,3125	1,81888
rps14-psaB-2	12	12	1316,5	656	2662,5	2047	0,6741	0,334	2,01826347
psaB-1	12	12	4891	2055,5	5786	5122	1,3097	0,403	3,24987593
psaB-2	12	12	968	300,5	1296,5	646	1,1025	0,415	2,65662651
psaB-psaA-1	12	11	857	417	1230	1080	0,9373	0,372	2,51962366
psaB-psaA-2	12	12	882	478	1140	1095	0,8995	0,394	2,28299492
psaA-1	12	12	2594,5	1087	4568	3143	0,8127	0,3335	2,43688156
psaA-2	12	12	1217	531	1422,5	1184	1,2012	0,4545	2,64290429
psaA-3	12	12	5960	1381	4696,5	3557	1,8214	0,439	4,14897494
psaA-IG-1	12	12	3906,5	918	4148	2448	1,1802	0,363	3,25123967
psaA-IG-2	12	12	697	292	863	601,5	1,1382	0,4465	2,54916013
IG-yef3ex3	12	12	961,5	529	1440	1223,5	0,9758	0,437	2,23295195
yef3ex3-in2	12	12	793	513	1342,5	1030,5	0,7966	0,4235	1,88099174
yef3ex3-in2-ex2	11	11	527	287	1004	720	0,6188	0,396	1,56262626
yef3in2	11	12	497	253	915	605	0,8386	0,424	1,97783019
yef3ex2	12	12	319,5	200,5	638,5	470	0,6433	0,4175	1,54083832
yef3in1	12	11	1593	549	2184,5	1132	0,9436	0,438	2,1543379

Anhang

Name	Anzahl der Replikate		Median(F635 Median - B635)		Median(F532 Median - B532)		Median(<i>Median of Ratios</i> (635/532))		Different. Anreicherg.
	CP33B	Kontrolle	CP33B	Kontrolle	CP33B	Kontrolle	CP33B	Kontrolle	(CP33B/ Kontrolle)
acf3ex1	12	12	959	440	1717	1111	0,7903	0,435	1,81678161
S-GGA	12	12	450	251	4125	4148	0,1365	0,0765	1,78431373
rps4-1	12	12	699,5	420	1270	968	0,8183	0,4555	1,79648738
rps4-2	12	12	332,5	261	866,5	648,5	0,5187	0,4085	1,26976744
T-UGU	12	12	384	168,5	1016,5	510	0,5201	0,3385	1,53648449
T-IG	12	12	354,5	204	3035,5	2104	0,1547	0,088	1,75795455
L-UAA ex1-in	12	12	536,5	333	5904	4140,5	0,1029	0,074	1,39054054
L-UAA in-ex2	12	12	336	296	2197	2892	0,175	0,1005	1,74129353
L-UAA ex2-IG	12	12	1039	704,5	4135	3661	0,3661	0,1985	1,84433249
F-GAA-1	12	12	184	147	3121	2173,5	0,07	0,065	1,07692308
F-GAA-2	12	12	604,5	293	1695	913,5	0,5481	0,285	1,92315789
ndhJ	12	12	516,5	373	1105,5	1152	0,6209	0,3225	1,92527132
ndhJ-ndhK	12	12	588,5	404,5	1400,5	1040,5	0,595	0,4015	1,48194271
ndhK	12	12	382,5	224,5	699	557	0,7931	0,4025	1,97043478
ndhK-ndhC	12	12	842	343	1356	873,5	0,8785	0,376	2,33643617
ndhC-IG	12	12	3005,5	1154	3661,5	3052,5	1,1648	0,395	2,94886076
IG ndhC-V-UAA	12	12	1080,5	495	1643	1249,5	0,8967	0,415	2,16072289
Vex2-in	12	12	609,5	296,5	1222	824	0,7315	0,396	1,84722222
Vin-ex1	12	12	445	321	2030,5	1418	0,3297	0,234	1,40897436
Vex1-atpE	12	12	374,5	301,5	3249	3188	0,1946	0,1035	1,88019324
atpE-atpB	12	12	414,5	342,5	1130	1177,5	0,4655	0,3085	1,5089141
atpB-1	12	12	874	1039	2606	3574,5	0,5138	0,306	1,67908497
atpB-2	12	12	741,5	364,5	1508	1120	0,7651	0,3345	2,28729447
atpB-3	12	12	867	475,5	2131	1702	0,581	0,303	1,91749175
atpB-rbcL	12	12	805,5	688,5	2616,5	2865	0,406	0,2395	1,69519833
rbcL-1	12	12	1506,5	559	9203,5	6701	0,2282	0,0845	2,70059172
rbcL-2	12	12	166,5	142,5	1573,5	1632	0,1148	0,0665	1,72631579
rbcL-3	12	12	884,5	469,5	7827	7955,5	0,1883	0,0635	2,96535433
IG rbcL-accD	12	12	736,5	500	1902,5	1802	0,5362	0,2945	1,82071307
accD-1	12	12	370,5	220,5	1004	668	0,5684	0,2965	1,91703204
accD-2	12	12	677	426	1818	1436	0,4893	0,2795	1,75062612
accD-3	12	12	704	384	1365,5	1240,5	0,7315	0,3735	1,95850067
IG accD-psaI	12	12	1236,5	596	2184	1587	0,7203	0,3925	1,83515924
psaI	12	12	475,5	301	1399,5	845	0,5285	0,327	1,61620795
ycf4-1	12	12	1207,5	722,5	2885,5	2116,5	0,5334	0,274	1,94671533
ycf4-2	12	12	823	455	1570	1324	0,6223	0,318	1,95691824
cemA-1	11	12	953	605,5	1437	1559	1,085	0,418	2,59569378
cemA-2	12	12	1386	584,5	2138,5	1641	0,9191	0,3605	2,54951456
cemA-3	12	12	1323,5	554	2536	1587,5	0,7322	0,3145	2,3281399
petA-1	12	12	454,5	308	1126	905	0,5775	0,3175	1,81889764
petA-2	12	12	953	625	2548,5	2152,5	0,5432	0,2545	2,13438114
petA-3	12	12	1030,5	455,5	1683,5	1161,5	0,875	0,4045	2,1631644
IG petA-psbJ	12	12	804	378,5	1937,5	1518	0,5705	0,2725	2,09357798
psbJLF	12	12	739,5	433,5	6727,5	3590	0,1281	0,1045	1,22583732
psbFE	12	12	840	523,5	3162	2952	0,3794	0,1695	2,23834808
IG psbE-petL-1	12	12	1326	447,5	3746,5	1869	0,5061	0,209	2,4215311
IG psbE-petL-2	12	12	616,5	301,5	1262	772,5	0,7182	0,357	2,01176471
IG psbE-petL-3	12	12	809,5	214	1510,5	627,5	0,7903	0,3615	2,18616874
petL	12	12	1116,5	579,5	3732,5	2709	0,4739	0,2335	2,02955032
petG-W-CCA	12	12	854	376,5	2216,5	1493	0,5698	0,258	2,20852713
P-UGG	12	12	756	313,5	2695,5	2575	0,2765	0,106	2,60849057
psaJ	12	12	663,5	441,5	5939,5	4665	0,175	0,083	2,10843373

Name	Anzahl der Replikate		Median(F635 Median - B635)		Median(F532 Median - B532)		Median(Median of Ratios (635/532))		Different. Anreicherg.
	CP33B	Kontrolle	CP33B	Kontrolle	CP33B	Kontrolle	CP33B	Kontrolle	(CP33B/ Kontrolle)
IG psaJ-rpl33	12	12	1567,5	827,5	3247	3049	0,7602	0,279	2,72473118
rpl33	12	12	1512,5	342,5	2269,5	1008,5	1,0598	0,325	3,26092308
rpl33-rps18	12	12	2572	1054,5	4177,5	3253	0,9191	0,345	2,66405797
rps18	12	12	1110	541	1816,5	1466,5	0,8316	0,375	2,2176
rpl20	12	12	733,5	449	1455	975	0,63	0,405	1,55555556
rpl20-IG	12	12	617,5	336	1363,5	776,5	0,6783	0,4555	1,48913282
in1-rps12ex1	12	12	545,5	537	1374,5	1564	0,5978	0,364	1,64230769
rps12ex1-clpPex3	12	12	880	528,5	2239	1635,5	0,665	0,299	2,22408027
clpPex3-in2	12	12	1070	537	2380	1408,5	0,6993	0,3825	1,82823529
in2-clpPex2	12	12	684	563	1650,5	1472,5	0,5992	0,388	1,5443299
clpPex2-in1	12	12	788	267,5	1859	770,5	0,6713	0,365	1,83917808
clpPin1	12	12	1019	548,5	2228,5	1900,5	0,5663	0,3075	1,84162602
clpPex1	12	12	2406,5	810	4715,5	3739,5	0,7588	0,2365	3,20845666
psbB-1	12	12	2203	784,5	7451	5125,5	0,4557	0,168	2,7125
psbB-2	12	12	416	280	1763,5	1683	0,3297	0,169	1,95088757
psbBTN	11	12	653	411,5	1216	1839	0,686	0,2385	2,87631027
psbNH	12	12	643	259	2911	2097	0,2695	0,114	2,36403509
psbH-petBex1-in	12	12	814,5	389,5	2030,5	1380	0,5859	0,2985	1,96281407
petBin	12	12	1778,5	694,5	2083,5	1582	1,1102	0,433	2,56397229
petBin-ex2	12	12	3231	902,5	5248,5	3805	0,8302	0,195	4,2574359
petBex2	12	12	539,5	301,5	2270	2036,5	0,3472	0,1615	2,1498452
petBex2-petDex1-in	12	12	1044	500	2784,5	2435,5	0,5187	0,2015	2,57419355
petDin	12	12	1163,5	543	2353,5	1589	0,6314	0,279	2,26308244
petDex2	12	12	1781	541,5	2714	2913,5	0,7511	0,189	3,97407407
petD-rpoA	12	12	469,5	295	1002	915	0,5544	0,316	1,75443038
rpoA	11	12	858	525,5	2050	1491,5	0,693	0,3655	1,89603283
rpoA-rps11	12	12	743,5	370,5	1770	1037,5	0,6503	0,3785	1,71809775
rps11-rpl36	12	12	850	281,5	1898,5	794,5	0,6657	0,3735	1,78232932
IG rpl36-rps8	12	12	517,5	447,5	977	1226	0,7455	0,3725	2,00134228
rps8	12	12	609,5	548,5	1092	1409	0,7987	0,4425	1,80497175
rps8-rpl14	12	12	1653,5	625,5	2448,5	1729	0,8554	0,386	2,21606218
rpl14	12	12	901,5	453,5	1683,5	1318	0,7007	0,336	2,08541667
rpl16ex2	12	12	649,5	351	1151,5	790,5	0,7007	0,4005	1,74956305
rpl16in-1	12	12	1969	1076,5	3242	2742,5	0,9037	0,4155	2,17496992
rpl16in-2	12	12	494	205,5	825	440	0,8316	0,423	1,96595745
rpl16in-ex1	12	12	1044,5	660,5	1895	1703	0,8323	0,4475	1,85988827
rps3-1	12	12	1237,5	600	2257	1396	0,7546	0,4225	1,7860355
rps3-2	12	12	836,5	556,5	1431,5	1398,5	0,7518	0,432	1,74027778
rpl22	11	12	1013	563	1656	1340,5	0,945	0,4425	2,13559322
rps19	12	12	1914	650	3028,5	1539	0,9317	0,426	2,1870892
rps19-rpl2ex2	12	12	1597,5	743	2545,5	2155	0,8204	0,3595	2,28205841
rpl2ex2-in	12	12	1281,5	725,5	2578	2114	0,7406	0,363	2,04022039
rpl2ex2-in-ex1	12	12	1458	759,5	2854	2053	0,7077	0,369	1,91788618
rpl2in-ex1	12	12	975,5	568,5	2105	1533	0,7028	0,362	1,94143646
rpl2ex1	12	12	1341,5	692	2838	2029,5	0,7238	0,329	2,2
rpl23-I-CAU	12	12	1470,5	687,5	2486,5	1689,5	0,8267	0,41	2,01634146
I-CAU-ycf2	12	12	955	525	2637	1642,5	0,4186	0,251	1,66772908
ycf2-1	12	12	894,5	578,5	2424,5	1668	0,4998	0,344	1,45290698
ycf2-3	12	12	987,5	672	2527	1768,5	0,5677	0,3765	1,50783533
ycf2-4	12	12	1246,5	619	2806,5	1767	0,5663	0,3625	1,5622069
ycf2-5	12	12	718	494,5	1930	1134,5	0,4816	0,3905	1,23329065
ycf2-6	12	12	570	451,5	2054,5	1384	0,4004	0,3195	1,25320814

Anhang

Name	Anzahl der Replikate		Median(F635 Median - B635)		Median(F532 Median - B532)		Median(<i>Median of Ratios</i> (635/532))		Different. Anreicherg. (CP33B/ Kontrolle)
	CP33B	Kontrolle	CP33B	Kontrolle	CP33B	Kontrolle	CP33B	Kontrolle	
ycf2-7	12	12	862	623,5	2576	1797	0,4298	0,348	1,23505747
ycf2-8	12	12	1065	599,5	2068,5	1238	0,6727	0,385	1,74727273
ycf2-IG	12	12	763,5	450,5	1945	1308,5	0,5103	0,3805	1,34113009
IG-L-CAA	12	12	1304	551	3199	1409	0,532	0,4265	1,24736225
L-CAA	12	12	554,5	464,5	1960	1465,5	0,4032	0,3535	1,14059406
ndhBex2-1	12	12	1112,5	527,5	2714	1510,5	0,5558	0,3375	1,64681481
ndhBex2-2	12	12	497	281	1494	912,5	0,4935	0,3175	1,55433071
ndhBex2-in	12	12	856	380,5	1860,5	1010	0,6237	0,384	1,62421875
ndhBex2-in-ex1	12	12	1434	858,5	3609	2210,5	0,595	0,392	1,51785714
ndhBin-ex1	12	12	459	262,5	1115,5	818,5	0,5866	0,3515	1,6688478
ndhBex1-1	12	12	1112,5	622	2626	1828,5	0,63	0,3615	1,74273859
ndhBex1-2	12	12	1404,5	585,5	2916,5	1806,5	0,6923	0,3245	2,13343606
IG-rps7	12	12	566	346	1529	1031,5	0,525	0,3585	1,46443515
rps7-rps12ex3	12	12	1007	622,5	2738,5	2349,5	0,4809	0,293	1,64129693
rps12in2-ex2	12	12	1004,5	448	2918	1351,5	0,4886	0,338	1,44556213
rps12ex2	12	12	883	403	2611,5	1379	0,4627	0,301	1,5372093
rps12in1	12	12	1257	642	3528	2074,5	0,4893	0,3275	1,4940458
IG rps12-V-GAC-1	12	12	1188,5	355	3616,5	1157,5	0,4872	0,288	1,69166667
IG rps12-V-GAC-2	12	12	459,5	234	1473,5	856,5	0,4081	0,305	1,33803279
IG rps12-V-GAC-3	11	12	558	344,5	1989	1373	0,3892	0,2655	1,46591337
IG rps12-V-GAC-4	11	11	470	363	1855	1190	0,3808	0,306	1,24444444
IG rps12-V-GAC-5	12	12	448	270,5	1903	1078,5	0,3276	0,252	1,3
V-GAC	12	12	945	356	4210	1512,5	0,3486	0,2175	1,60275862
V-GAC-16S	12	12	351,5	498	20754	15002	0,0245	0,0355	0,69014085
16S-1	12	12	710	983,5	37694	19897	0,035	0,0495	0,70707071
16S-2	12	12	311	396	13777,5	7170,5	0,0336	0,057	0,58947368
16S-3	12	12	431,5	521,5	12399,5	8502,5	0,0476	0,066	0,72121212
16S-4	12	12	354	394	11934	7914	0,0385	0,0555	0,69369369
16S-5	12	12	246,5	147	3765	2901,5	0,0987	0,0565	1,74690265
I-GAU ex1	12	12	490,5	220	4515,5	2747	0,1505	0,0795	1,89308176
I-GAU ex1-in	12	12	354,5	125,5	1199,5	759	0,4165	0,1675	2,48656716
I-GAU ex2	10	12	484,5	231	4034,5	2970,5	0,1708	0,0825	2,07030303
I-GAU-A-UGC	12	12	163,5	97	1172,5	793	0,1848	0,1305	1,41609195
A-UGC ex1-in	12	12	287	112	1342,5	589	0,3234	0,184	1,7576087
A-UGC -in	12	12	414	212	2122	1153	0,2779	0,1705	1,62991202
A-UGC ex1	12	12	295,5	143,5	2048,5	843	0,21	0,185	1,13513514
A-UGC-23S	12	12	262	366	15389,5	11385,5	0,0245	0,0395	0,62025316
23S-1	12	12	159	236,5	11735,5	7756,5	0,0203	0,0315	0,64444444
23S-2	12	12	56	129	3026,5	2855	0,0287	0,048	0,59791667
23S-3	12	12	292	441	15407	11179	0,0252	0,04	0,63
23S-4	12	12	407	743	22195,5	18027	0,0287	0,0455	0,63076923
23S-5	12	12	229	318,5	12708	10437	0,0252	0,0325	0,77538462
23S-6	12	12	145	141,5	4119	2794	0,0476	0,055	0,86545455
23S-7	12	12	366,5	869	17286,5	15468	0,0329	0,0555	0,59279279
23S-8	12	12	149,5	298	6883,5	6379,5	0,0301	0,0525	0,57333333
23S-9	12	12	151,5	201	8054	7717	0,0252	0,0265	0,9509434
4,5S	12	12	254	211	6573	5012,5	0,0553	0,044	1,25681818
R-ACG-1	12	12	463,5	362,5	3773,5	2478	0,161	0,1335	1,20599251
R-ACG-2	12	12	713,5	450	1954	1027	0,5187	0,4145	1,25138721
N-GUU-1	12	12	223,5	154,5	701,5	553,5	0,4032	0,277	1,45559567
IG-ycf1	12	12	790	478,5	2871	1672,5	0,4326	0,267	1,62022472
3'ndhF(ycf1)	12	12	1298	601	2273,5	1209,5	0,8162	0,476	1,71470588

Name	Anzahl der Replikate		Median(F635 Median - B635)		Median(F532 Median - B532)		Median(<i>Median of Ratios</i> (635/532))		Different. Anreicherg.
	CP33B	Kontrolle	CP33B	Kontrolle	CP33B	Kontrolle	CP33B	Kontrolle	(CP33B/ Kontrolle)
ndhF-1	12	12	1642	583,5	2472,5	1336,5	0,9947	0,466	2,13454936
ndhF-2	12	12	1610,5	900	2763	1915,5	0,7959	0,458	1,73777293
ndhF-3	12	12	1102	612	1828	1446	0,7749	0,3935	1,96925032
ndhF-4	12	12	1271	859	2092,5	1689	0,9625	0,514	1,87256809
ndhF-5	12	12	1142	416,5	2118	1142	0,7518	0,4025	1,86782609
ndhF-IG	12	12	310,5	165	385	445	1,0346	0,4165	2,48403361
rpl32	12	12	353	82,5	1121,5	429,5	0,4683	0,188	2,49095745
IG rpl32-ccsA	12	12	410,5	173,5	740,5	358,5	0,8421	0,5085	1,6560472
IG-ccsA	12	12	255,5	144,5	596	363,5	0,6069	0,414	1,46594203
ccsA	12	12	1577	998,5	2439	3015	0,819	0,3615	2,26556017
ccsA-ndhD	12	12	695	371	1055,5	698	0,8722	0,527	1,65502846
ndhD-1	12	12	518	344	1038,5	789	0,7238	0,4365	1,65819015
ndhD-2	12	12	432	216,5	764	440,5	0,819	0,4585	1,78625954
ndhD-psaC	12	12	1452	582	1946	1488,5	1,0458	0,4395	2,37952218
psaC-ndhE	12	12	1926,5	974,5	4656,5	3648	0,6139	0,257	2,38871595
ndhE	12	12	717	303,5	1292	728	0,847	0,454	1,86563877
IG-ndhG	12	12	1478,5	810	2647,5	1725,5	0,7917	0,401	1,97431421
ndhG	12	12	754	345,5	1738	1141	0,6909	0,3065	2,25415987
ndhG-ndhI	12	12	1838,5	1166,5	2843,5	2681	0,9065	0,418	2,16866029
ndhI	12	12	633,5	344	1164,5	773,5	0,7819	0,418	1,87057416
ndhI-ndhAex2	12	12	636,5	411	826	863	1,0003	0,4835	2,0688728
ndhAex2-in	12	12	467,5	303	862	685	0,7217	0,4715	1,53064687
ndhAex2-in-ex1	12	12	763,5	525,5	1519,5	1302	0,5964	0,3975	1,50037736
ndhAin-1	12	12	889,5	580	1394,5	878	0,8862	0,5585	1,58675022
ndhAin-2	12	12	473,5	276	786,5	467	0,7784	0,5335	1,45904405
ndhAin-ex1	12	12	509	317,5	962	690	0,7119	0,4805	1,48158169
ndhAex1-ndhH	12	12	1216	855	1754,5	1411	1,064	0,515	2,06601942
ndhH-1	12	12	457,5	310	957,5	665,5	0,7063	0,4595	1,53710555
ndhH-2	12	12	392,5	229,5	617	402,5	0,9653	0,5915	1,63195266
rps15	12	12	628,5	387	1145,5	774	0,9037	0,5265	1,71642925
rps15-IG	12	12	581	312	902	667,5	0,9212	0,5125	1,79746341
ycf1-1	12	12	783,5	395	1188,5	723	0,9583	0,516	1,85717054
ycf1-2	12	12	911	418,5	1332,5	837	0,9079	0,5275	1,72113744
ycf1-3	12	12	1793	751	2080,5	1248,5	1,2474	0,645	1,93395349
ycf1-4	12	12	999,5	532,5	1535	954	0,9744	0,559	1,7431127
ycf1-5	12	12	1155	471,5	1545,5	791	1,0619	0,632	1,68022152
ycf1-6	12	12	1191	559,5	1714,5	1005,5	0,9975	0,575	1,73478261
ycf1-7	12	12	790,5	488	1457	1026,5	0,7182	0,4825	1,48849741
ycf1-8	12	12	774	480	1543	1147,5	0,6475	0,446	1,45179372
ycf1-9	12	12	1184	555	2504,5	1031	0,6524	0,4605	1,41672096
N-GUU-2	12	12	786	478,5	3482	2457	0,2989	0,1755	1,7031339
IG N-R	12	12	816,5	719	1909	1423	0,6146	0,4665	1,31747053
ycf2-9	12	12	832,5	512	1985,5	1307	0,5684	0,3715	1,53001346
ycf2-I-CAU	12	12	946,5	392	3249	1369	0,3997	0,265	1,50830189
18S	12	12	104	108	2193	2103	0,0574	0,061	0,94098361

Anhang

Tabelle 8: Sequenzen der Oligonukleotide zur Synthese der PCR-Produkte für den Arabidopsis Plastom-überspannenden *tiling Microarray* und die Genomposition (in bp) der resultierenden PCR-Produkte.

PCR-Produkt	Primer 1	Primer 2	Genomposition	
			Start	Ende
H-psbA	GAACGACGGGAATTGAACC	TTGGGCTGATATTATTAACCGTG	7	497
psbA	TGTGAAATGGGTGCATAAGAA	GATCCCTACCTTATTGACCGC	850	1334
psbA-Kex2	TCAATATCTACTGGAGGAGCAGC	ATCCGACTAGTTCGGGTTC	1263	1753
Kex2-matK	TTGAATACGATCCGTAGTGGG	GGAAGACCAAGTCTTTCTTTA	1700	2177
matK-1	TTTCTAGCATTTGACTACGTACCAC	TGTATGTGAATACGAATCCATCTTT	2523	2929
matK-2	GGTTCACATCCTTAGTGGGAA	AACGAACAGAAACCTATTAAGATAGAG	3321	3749
Kint	AGATACCTCATAAACAGGTAGACTGC	TGCTTCTCGATCGGTACAAT	3686	4161
Kint-Kex1	TTCACTTGACCCAAATTGGAA	TCATTGTATGAACTAATGAACCAAGA	4090	4577
IG_K-rps16	AAAGCTTAACCTCTGGTTCATTAG	TCTACTCTTCTCTTCACTTCCATCA	4541	5000
rps16ex2	AAATAAATATGATGGAAGTAAAGAGAA	TTCTCGAGCCGTACGAGG	4966	5357
rps16ex2-in-ex1	ACCCACCTTACTAAGATCTCTTCTT	TTTAAAACGATGTGGTAGAAAGCA	5213	6174
rps16in-1	TTTGGCCTCGTACGGCT	TTTGTATAGAAAGAACAGAAATCATAACA	5335	5779
rps16in-2	AAAGGCAGCAACAAGCC	CGATGTGGTAGAAAGCAACG	5724	6167
rps16ex2-IG	CCACAGCAGATAATGTCCTTCA	CAATCTTCTATTGCCTTGTACACC	6114	6596
Q	TTTAAACAGAAAGAGAAAGATGGTG	AAATGGTGTCTTGTGGATAATTT	6551	7011
psbK	AAATTAATATCCACAAGAACACCA	TCTAATTAGGTTCTTTCATTTAGGGAA	6982	7393
psbI-S	GGTAGCCATACTAAATCTGGATCA	GGGTTCGAATCCCTCTCTTT	7316	7807
IG-psbI-G-1	TCGAACCCTCGGTACGATTA	TTTGAGTTCGCGCCTTTTT	7800	8309
IG-psbI-G-2	GAACCTTCTCAGCAATTCTAGTTACATT	AATCAAACCGAGAGACCCTTT	8239	8722
Gex1-in	CAATAATTCATTGTAGCGGG	CAATATAATATGTCGATGTCTTTAGTAAACC	8630	9058
in-Gex2	GAGAACTTTGGTTACTAAAGACATCG	GGCAATGTGAATTTAGAGCG	9019	9448
Gex2-R	AAACCCCTTAGCCTTCCAAGC	AAGCATTGAGAATTTCTTCTTATTCT	9380	9779
atpA-1	AAATAGAATAAGAAAGAAATTCTGAATGC	TGAAACAATCCCAATCAGCC	9749	10200
atpA-3	CCTGGATAAGCTTCACGACC	AGACGTTCTGTATATGAGCCTCTTC	10596	11044
atpA-atpFex2	ATTGCTCAATACGTTACGCG	GAAGAACTGCGTGAAGGAGC	11404	11882
atpFex2-in	TCCGTTTCTACGTTACGCAAG	AAAGAAACAACCTTGTGACAATTA	11812	12234
atpFex2-in-ex1	TGAATAGCTCCTTCACGAGT	TTAGCAACAATCCAATAAATCTAAGTG	11857	12720
atpFin-ex1	TTCGGAGGATTCTTCTGACC	GTGTGTGTGAGTTGTTCAATTTCAA	12177	12657
atpFex1-IG	CAGCCTATTCTTGAATGAACAAC	GATTCGCTTCTTCTCTCC	12624	13130
atpH	GGAAGGAAGAAAGCGAATC	TTACGCTCAAGTCATTGGATGAT	13111	13574
atpH-IG	TCCAGGTCCAATAGAAGCAAG	TTTAGATTTAGATAGGGATTTCGATTAGA	13433	13852
IG-atpI	GGAAGAACTCTAATCGAATCCC	CGGAAATATATTAGCCGATGAA	13816	14192
atpI	AGGTATAGGAACCACTAAAGGTAATAAGA	CTTATTAGGTTCCGAGTTCTAGC	14120	14618
atpI-rps2	GCCGTCAGTTGGAATTGTTT	GGGCCGTTCTAGCTATATACAAA	14561	15043
rps2	TTTGTATATAGCTAGAACGGCCC	GGCTGCAATACGGGCTC	15021	15466
rps2-IG	ACCAATTTGTAAACATGCCG	TTGTTGTGTAGTCAATTTGCTT	15399	15898
rpoC2-1	TTTATTAGTGTTAACAATTACGAAAGCA	GCGTGCTTTAGAAGAAGCAA	15852	16310
rpoC2-3	ATTGAATCAATCGAGCGGAC	AATGGCAAACCAACTCGAGG	16602	17617
rpoC2-4	AGATCAATCCCGAATCTGGC	TTCAGAATTGAATGAAACTTAGG	17395	18443
rpoC2-5	GATCAACCCGCGACTT	TTCAGAATTGAATGAAACTTAGG	17948	18443
rpoC2-6	GATCAACCCGCGACTT	AAGTGATTGCTGAGATTTCGC	17948	18810
rpoC2-7	AATTAGACTAGATCCACATG	GTATGAGAGGATTAATGTCTG	18583	19626

PCR-Produkt	Primer 1	Primer 2	Genomposition	
			Start	Ende
rpoC2-rpoC1-1	CGTAAGATATCCAGCATCTG	TAGTCCTTTGTGGCTTCGGT	19460	20497
rpoC1ex1-1	ATCATATGAACAGGCTTGAG	GGGAATTAGTAATGTGTCAGGAAA	20257	21341
rpoC1ex1-in	TTCGAAATCTAAATCGGCT	CACTAAAGAATTTAAATAGAAATCAAAGAAG	21666	22101
rpoC1ex1-in-ex2	ATTCAAATGAACCTCGTAATCGTAA	TATGGTATTTGAAACGTCTTCCTAGTTAT	21798	22738
rpoC1in	TCAAGTTCTCAGTGCAAACCA	AAAGGCGATTGGTCTATGGTC	22023	22497
rpoC1in-ex2	TTACAGAGGTACGCCTATCA	TTGGACCTATAAAGAGTGGAATTTG	22440	22903
rpoC1-rpoB-1	TTTCATCTCCGATCACTCGAT	TTTACAAGAGATGCTTACTTATAAATCTGA	22844	23321
rpoC1-rpoB-2	TTTCATCTCCGATCACTCGAT	TACTTGGCATTCAAGGTATCG	22844	24039
rpoB-1	CCACGGGTCTCCCGTCTTGC	AGCACGGATACGGATGCTTT	23779	24941
rpoB-2	GTTGATACATAATTAATGGAATGCTTAGAG	AGCACGGATACGGATGCTTT	24487	25791
rpoB-3	GCTCCGGAGATAGTTCCCTT	TTCTAGTTCTATCATCAGCTATGGG	25302	25791
rpoB-4	AAATTCAGGGTAGCAAACATTC	AAATGGAAGATATAGATCACGAAATTGA	25720	26211
rpoB-IG	TCAGAGGTTCTACCAATTGATATGTT	AAACTCCGTAAGTTCCAGCG	26140	26594
IG rpoB-C	AAGAAATAGATCCAAATGGAACAGA	TCCCTTGAAGAGAACATTTC	26538	26993
IG-C	TTGTGGTACAGTTCTATTGGGA	CTTACCCTCGGCCATGC	26924	27394
C-IG	GCATGGCCGAGTGGTAAG	AAATGAAAGGCAATTCCTTAATCTAATC	27377	27784
IG-petN	CTCATGAAAGTCTCGGAATGC	AAGTATTTCTAGAGTCCACTTCTTCCC	27716	28186
petN-IG	TGGGCTGCTTAATGGTAGTTT	AGCCATTATGGTTATTGTAATGTATAAAGA	28110	28569
psbM	TCACTTGTATCTTTATACATTACAATAACCA	CTCCGATATTGTTATTCATGATATTTCT	28531	28967
IG psbM-D-1	TCGCTTGTAACCTACTCAGATGAA	TTTACC GGACTCGTCTTTG	28890	29325
IG psbM-D-2	AACAAGAAAGGGAAATGTGACAA	TAACTAGGGTAGAGAAACATATGTAATGA	29286	29683
D	CCCATACAGTATCTTTCTTGAAGT	TCAATTGATTTGATAAATGTAAAGGATT	29608	30064
Y	CACTTTAGTGAGAGCAAGACGG	GGGTAGGGTACTACGAAAGGAA	30004	30470
E	CATCGACCCAGGAAGAATCTA	GAGGCAATCTATCAAGGAAAGTAAA	30398	30897
IG E-T	ACTTTCCTTGATAGATTGCCTCA	ACAATAGACGCATAGTGGTTAGTAGC	30876	31297
T	TGAAGTCAATTCAAATTCTCATTT	TTTGGATTGTGCGATTCTAATCT	31233	31705
IG T-psbD-1	GTCGTCTCTGAATCGCCA	AGTTTCTTTCTCACATACACCTTCG	31631	32130
IG T-psbD-2	TCCATATTGATGCATCCGAG	TTTCATTTAATTGGTTTCGAAGAT	32068	32553
psbD-1	TCCGTTTACCTAAGTAAGGACCA	GAATGCGCTAACTATTAGCAGG	32489	32976
psbD-2	CCAGTTCATTTAGAAGGTTGC	TTTGCAACATCACCATCTTC	32904	33402
psbD-psbC	GGCTCTGCTATGCGCTATTC	GGCCACCAAGCGAA	33334	33830
psbC-1	TTAATGGAACCTTAGCTTTAGCTGG	GCCTTGAATACTAGAAGAAAGGCA	33769	34255
psbC-2	TTTGTTAGGTGTAGGTGCCTTTC	AAAGTAAATGCTTGAGCTTGAGAAG	34217	34669
psbC-S	TTTCTATTCTGTTGGTCAATTT	AGACCTATTAAGAAAGTCACACCC	35024	35514
S-psbZ	AGAACATAGCCCTATGAGTTAATACGA	GATAAGAGAATTAAGGATACCCACCA	35441	35933
IG psbZ-G	GAATTCATTCTGTTGCAGATCC	ACGAGATACACTCTTGGTTTGG	35938	36436
G-fM	CCAAACCAAAGAGTGTATCTCG	TTCTATGATCGATGAGGCC	36414	36905
fm-rps14	AAAGTTGCGGAGACAGGATTT	TCATTTGATTCGTCGATCCTC	36700	37181
rps14-psaB-1	TCCATTTCTCACTTAGCGACG	TTCTTAATTTCTGGCGTGG	37117	37593
rps14-psaB-2	TCCATTTCTCACTTAGCGACG	TTGCTGGCTGGTTAAATGC	37117	38100
psaB-1	ACCTCGTCCCGACCATCGC	CCCGACTCGAGTAGTCATTTATT	37885	38871
psaB-2	AGCTCTGTATGATGAATCC	CCCGACTCGAGTAGTCATTTATT	38422	38871
psaB-psaA-1	CTATATTCACCGGGCCAAGA	CTCAGCCTAGAGCCTTGAGC	39234	39723
psaB-psaA-2	CTATATTCACCGGGCCAAGA	ATGTGACGGTATTGATACTG	39234	40233

Anhang

PCR-Produkt	Primer 1	Primer 2	Genomposition	
			Start	Ende
psaA-1	ACTACCCCAAAACATCTGACTGC	GTTAACCGATATAGCACATCATCA	40001	40997
psaA-2	AAACTGTGGAAGCCTAGAAATATACA	GTTAACCGATATAGCACATCATCA	40509	40997
psaA-3	AAACTGTGGAAGCCTAGAAATATACA	ACTCACATTGGACCTAGTGC	40509	41542
psaA-IG-1	CCAAGTCCTAGTAGCCCTGC	AAATAGGCTACATTTTCGGAACCTAAT	41241	42202
psaA-IG-2	TGGTAGTATCAGGTCCTTAGCTATT	AAATAGGCTACATTTTCGGAACCTAAT	41728	42202
IG-ycf3ex3	AACCTAATCGAGTGTATTCATATTCA	AGCACAGAATTGGTTGACGA	42147	42623
ycf3ex3-in2	AACCTAATCGAGTGTATTCATATTCA	AGCACAGAATTGGTTGACGA	42574	43050
ycf3ex3-in2-ex2	TCCAATACTCAGCGGCTTG	TTCCGGCATTAGAACGAAAC	42661	43591
ycf3in2	AAAGCATGTCCACTGTTATTAGATATTAGA	AGGGCTTCTACATAAGCATCG	43028	43455
ycf3ex2	CGATGGATGAAGTTTAGTTATTGTC	TTTCATTATGCACCTAAAGGAGG	43384	43848
ycf3ex1	CCCTATGCCTCCTATTTCGTATATT	AGTTCGTACTATACAATTCCTTTGTTG	44202	44686
S-GGA	TTTCTCACAAAACAAAGGAATTGTAT	TTTCATGTATCATAGATTGGTAGGGA	44652	45104
rps4-1	GGAAGAGCAAACAAGGGAT	GCTTTGACTATTCTCAAGCG	45053	45528
rps4-2	GTCCATGATTAACCTAATTGGCG	TCTTTGTATTCCAATAGTGGAGTGATT	45486	45936
T-UGU	ACTGAACCTAAATGATAATGATAAATGACG	TTGATACGATCTAGTAGTTAGTGAATTG	45877	46338
T-IG	CTCTGAGCTAAGCGGGCTC	TTTGTATTGCAATTCAATATGGTT	46269	46732
L-UAA ex1-in	TCGACCGTTCGACTATTCTG	TGAACACAAGGTAGTGAACCTCA	46632	47129
L-UAA in-ex2	AAGGGATAGGTGCAGAGACTCA	GGGATAGAGGGACTTGAACCC	47065	47488
L-UAA ex2-IG	AAATCGTGAGGGTTCAAGTCC	TTTCAGTCTCTACTAATGGTGACA	47459	47872
F-GAA-1	CCTTCGGTAATGGTCGACATAG	AAATCCTCTGCCAAGAACCA	47798	48255
F-GAA-2	CTCAGTTGGTAGAGCAGAGGACT	AAATGAGCCAATAGGATGAACTAAA	48185	48668
ndhJ	TTGACTAAGTTATGTGCGCGA	TCGATTATCAAGGAATAGAGACTTTACA	48593	49092
ndhJ-ndhK	AAATTACAGCAATAGAAATGCCAAT	CTAAACCAGAGGCTGTTATAGACG	49027	49513
ndhK	TTCGATCCTTATAGATTCTCTAGCTATT	TTATGAATTCCATTAAGTTTCCCA	49439	49936
ndhK-ndhC	TCATTTAACGTAGTTGAAATAACGGA	TTTACTAATATCAAGTGCTATTCTGTTT	49864	50325
ndhC-IG	TCCGGAAATTAGAAATGCCA	AAGATGAGTATGGTAAAGTCTTACTGGA	50277	50737
IG ndhC-V-UAA	AAATCCAGTAAGACTTTACCATACTCATC	TTTGTATTCTTTATTCTAACAGGTTACTTT	50707	51132
Vex2-in	CAGGACTTATGGTTTATGATATGGAA	AAAGCAAACCTACGTCAAGAGAA	51051	51481
Vin-ex1	GAATTCTAATACAATACAGAAGAACTACCA A	AAATGTGTATCACAAACACAAGGG	51411	51891
Vex1-atpE	AAACTTTGGCGCACGTGTA	CTCTCAGACGAGCTCGGACA	51819	52311
atpE-atpB	CAAATCGTATTGAGAGCCTCG	TTACTTAGTGGTAAACATCGATGAAG	52266	52735
atpB-1	GTCATTTCTCAATTTACTCTCCATT	GCACCTGCCACCACATT	52659	53145
atpB-2	ACCTTTGGCAGCTAATCCTCT	TGGTGTATCCGTATTGGTGG	53077	53575
atpB-3	CTCGATTATTTCTAATAATTGCTGT	AACTAGGTTTCAGTTAGTTGAGCTTGA	53937	54360
atpB-rbcL	TTCAAGCTCAACTAAGTAAACC	TTCTTTCATATGTATAGCGCAACC	54332	54766
rbcL-1	AAAGAAGTATTAGGTTGCGCTATACA	ATCAAGGCTGGTAAGCCCAT	54731	55191
rbcL-2	TTACCAAAGATGATGAGAATGTGA	ATACCGCGGTTTCGATCT	55552	56042
rbcL-3	GGAGTCAACTTTGGGCTTTG	AAAGATTGAGCCGAGTGCAA	55974	56459
IG rbcL-accD	TGTGTGTCCACAAGAAATCCT	TTTCCATAGAGCTTCTGGCCT	56601	57081
accD-1	TCTTAGCAATTGCATCGATATGTT	TCATCCGATATGAAATTGCG	56931	57319
accD-2	AAATTACAAGATAAGAATAATAGGAATCG	AGAGGTAAACATTGATTGGTAGCAT	57671	58147
accD-3	TGGATGCAATTGTACCACGTA	AGAATCTGATCTAACAAACAGGGAA	58453	58842
IG accD-psaI	TGCAGATCTATAGAGAGTCTCCATC	AAATGGGTACCTCAATTTAATATTTGT	58774	59245

PCR-Produkt	Primer 1	Primer 2	Genomposition	
			Start	Ende
psaI	CTTTAGAATTCAGAATATAACAATAACAGGT	TTACCTTAGGAGTAATTCATAGAATTGTTTA	59188	59664
ycf4-1	TATAACAATTCTATGAATTACTCCTAAGGT	CATAACCACTACCCACATTCCA	59632	60048
ycf4-2	TATGGGATCGCAGGTCTCTT	AATTTGAGACAAAATAAACTCCTTT	59976	60475
cemA-1	AAAGGAGTTTATTTGTCTCGAAAATTAG	CGCATGTCTAGTATTCCACCA	60451	60873
cemA-2	TGGTTGATCTCTCTGCTGTAA	CAATCATTAGTTCCCAACCGT	60801	61263
cemA-3	ATGTATCGGATTCCATTGCGC	AGGTATTTCTAGTTGTCATGGTCC	61220	61675
petA-1	TCGACCTAGCTAACTTTATTGTAGAAA	TTTATTGGGACGATAAATCTGAAA	61607	62088
petA-2	CGATCGTATTTACCCGAGA	TGGATCTTGAAGTACTATTTCCGC	62019	62505
petA-3	CATTAACGAGTAATCCTAATGTGGG	TCAATTTCAATTGGTCAATAACG	62438	62864
IG petA-psbJ	GGGAACCATAAAATCGGCG	GGGTCCCCTTGAACCTGCTA	62961	63456
psbJLF	ACGTCTATAACTCAGCTCATCCAA	CATGGACTAGCTGTACCTACCGT	63511	64010
psbFE	GGTTTATCGTTGGATGAACTGC	AAATACCCTTGGTACTTTATTGACG	63939	64436
IG psbE-petL-1	CACTGAGATTGCATCTTTGTGAG	TTCTTGTTCTGCAAATTAATTCCT	64387	64843
IG psbE-petL-2	TTTAAGGAATTAATTTGCAGAAACA	GAGGTATCCTACACGGAGAACG	64815	65177
IG psbE-petL-3	AATCTCGTTCTCCGTGTAGGA	TTGTGAATTATCAATCATTATAGGTGG	65151	65578
petL	GCCAAAGACGATGAATTGAGTT	GAGAGTACTACTATTCTAGCTCTTAATC	65501	65958
petG-W-CCA	TCATTGAGATTCATTGGCAATAC	CGAGTCGGGTTAAAGAATGC	65904	66367
P-UGG	AAAGGCTAGAAAGAGGGCATT	AGAACGATCTTATCGATTCCATT	66332	66777
psaJ	GATAAGATCGTTCTAGTCGACAATATTA	CCCATTGTTGATTGTATCTCT	66764	67115
IG psaJ-rpl33	TTAGAGATAACAATCAACAATCGGG	CGAACATCTTTACCCTTGGC	67092	67510
rpl33	AAGATTGAGGTGAATCATAAATCCA	AGAATATCGGATTAGATTTCTTTCTATTG	67452	67815
rpl33-rps18	GTTTCATGGCCAAGGGTAAA	GGGCAAACGCCTACGAA	67483	67976
rps18	TTATCTAGACGGGTGAATAGAGTGA	GGATTGGAAGAAATCCACGA	68055	68509
rpl20	CCCAGCTCATTCTCCTTAG	TCAATGACTAGAATTAACGCGG	68451	68868
rpl20-IG	AAGCTTGATGCAAATAACGAA	GGGATCTCATTGTGAAAGACCT	68795	69266
in1-rps12ex1	CTTGACAAATTCACATTCTTTGGC	CAAGACAGCCAATCCGAAAC	69196	69693
rps12ex1-clpPex3	ACATGTTCTCGTCGCTGA	TTTATGAGGCACAAACGGGA	69623	70106
clpPex3-in2	GTGATGGTTTCGCGAAGTTT	TGAAAGAGTAGTATGAGATAAGGAAGAGG	70037	70510
in2-clpPex2	AAGTTTGTGACGCTGAAATGTG	TTTAGGCCAAGAGGTTGATACC	70431	70914
clpPex2-in1	AATAAGTTGATTGAGATTTCCGGT	TTGGTTCAATTTGTCCTATATGTGC	70872	71340
clpPin1	TTGCACATATAGGACAAATGAACC	TCGATCGAGATATCCTCTGTTTC	71315	71760
clpPex1	TTTGGCTTCGCGTTAC	TCCGATAAGTACCAATATGCAATG	71688	72185
psbB-1	ACAACAATAGCTATCTGGTTCATAGA	CCCAAGAATTGGTTATTCTAAA	72119	72596
psbB-2	CGGGAGGAATAGCCTCTCAT	TAGGCATGCGGCGTACA	72954	73451
psbBTN	TGCTAGAACCCTCTCAGAGATG	AGATCCATTGAGGAACACG	73780	74276
psbNH	AAATATTGGAGGCTGATTACGTT	AATTCAGTAAATTCATCCAG	74223	74704
psbH-petBex1-in	AATCTTCTGTCTACTGGATGGAA	AAATACAAAGAAGCGTTTGTCTCT	74668	75122
petBin	TTGGATCAAAGGACAAACGC	AATGCGAAAGCTCGTCTTTG	75091	75471
petBin-ex2	AACACAACATAAAGACGAATGAGC	TGATCGGATTAACCAACAAA	75402	75896
petBex2	TGACTGAAGCTAATTTGGTTGG	ACCTAGAATCTATATTATTATAAGGGACCA	75862	76310
petBex2-petDex1-in	TGTTAATGCATTTCTAATGATACG	TGTTCCATCCCTAATCTACTGG	76240	76701
petDin	TTTCTATGATCGTACCCGACG	CTCGAGCAAGAATTAACCAAAC	76629	77127
petDex2	TTTAGTTGGTTAATCTTGCTCG	AAGGGTACGGTTAATAATCCCG	77102	77527

Anhang

PCR-Produkt	Primer 1	Primer 2	Genomposition	
			Start	Ende
petD-rpoA	GTCGTCCAGTAGCGACAACC	CCAATTAGAATTGCCTCCCA	77563	78060
rpoA	GGAGTTAAACTTCCATTTGTCCA	GCGATGCGAAGAGCTTACT	78259	78749
rpoA-rps11	CATGTTCCCTTATTTCGCCA	GGAACACCCTTTGCTGCC	78709	79178
rps11-rpl36	GCATACCTTGATCCACTACTGCT	AAATAAGGGCTTCCGTTCGT	79112	79598
IG rpl36-rps8	TCCTGCGGATTAGTCGACAC	CTTAATCACTTCCGAACGGC	79545	79923
rps8	AAATCGAACCATGCCGTTTC	CGTAAGGAAACATCGCGAAA	79892	80332
rps8-rpl14	CTTTCTTATTTTCGTCTATGTCTTAGGG	ATCCCACGGGAATTGAGAC	80262	80761
rpl14	AATTGTCTCAATTTCCCGTGG	TTTACTTCGTCTTTGCATTAAA	80739	81110
rpl16ex2	CATTCAAATAGGTTTGTGGTTGA	TCTTCTCGTGGGAATCGTATTT	81037	81536
rpl16in-1	TAGATGTGATCCAAGCGGGT	ATTGAAAGAGTAAATATTCGCCG	81464	81962
rpl16in-2	CGCCGGCGAATATTACTCT	CCAATTTGAAAGTCTATGAGGTC	81937	82345
rpl16in-ex1	TTCTGAATGAATCTGTATTGATGCT	AAACTCCTTTGATATAATTGCTATGC	82273	82674
rps3-1	TTTATCTTTATCTAATCCTAAACCAACGA	TTGAATTAAGTGAACAGGCGAA	82608	83037
rps3-2	TTTCCGTCGATACGTCCTG	CCACTTGGTTTCAGACTTGG	82971	83464
rpl22	GGTTGTGCAACCAAAGAGAA	ATGTCTGCCATAAAGCACG	83406	83886
rps19	GCTTCTTCATAGGAACGTCCA	GAGAAGCTTAATACAAAGGCGG	83825	84226
rps19-rpl2ex2	TGGGTATAATGGTGGATGCC	TTACCTTCTGGAGAGGTCCG	84157	84642
rpl2ex2-in	CCAACATTTCCCACTTGTCC	GAAGTATCGACGTAATTCATAGAGTCA	84572	85071
rpl2ex2-in-ex1	CGGACCTCTCCAGAAGGTAAT	AAATGGGAAATGCCCTACCT	84623	85476
rpl2in-ex1	CGTTCGGTCATCTGGCTTAT	AAATGGGAAATGCCCTACCT	84998	85476
rpl2ex1	TCCAATTACGTAATCAAATAGTTCAA	AACCGGTTTATTCTATTCCACC	85419	85905
rpl23-I-CAU	AAGAGGTGGAATAGAATAACCCG	AATTCCTACTGGATGCACGC	85880	86328
I-CAU-ycf2	TTCCATTGATACAGAGCCAATTC	AATACGATATAGAAGGGCCGC	86259	86749
ycf2-I-CAU	TTCCATTGATACAGAGCCAATTC	CGAAGAGATCTGGTGGAAATTGC	86259	87461
ycf2-1	GAATTCGGGACAGCTATTCG	AACCTCCTCAAGAATTGTCTTTG	87223	88435
ycf2-9	TTTCTCTGACAGATGGTCAGAACT	AAAACGGCTCTTCCGCTCAG	87961	88987
ycf2-3	CGATCAACCAACATTTATCG	ATCGAGTAAATAGCTCTACG	88800	89916
ycf2-4	TCACTATCTTGTTCATTAC	AATTGTTCCAGAGCAACTAG	89688	90750
ycf2-5	TATCGACACATCTGAGATCG	ATCATAGTTAGAAGCTCCAG	90486	91626
ycf2-6	TTTAGTGATAGGTTCTATAGG	GATCATTATCAAACGACTGTC	91405	92558
ycf2-7	GTACAAATGGTACTTCGAGC	TCCACTTAATCCCTATTCATGG	92308	93428
ycf2-8	AGGTCTTCAAAGAACAAGGC	TCCACTTAATCCCTATTCATGG	92930	93428
ycf2-IG	ACAGGAGAAGGGTTCCCAT	ACAATTAGAATTAGGCTCGGTCA	93363	93838
IG-L-CAA	CCCTATATGGATAAGACACATTCCA	GAATAAGTTCCGGCAGCGGAT	93789	94262
L-CAA	CCATTCATTAGATAGAGAAGATCGC	TCCCTACGTCGTTACATTCCA	94206	94691
ndhBex2-1	AGGTCAGATTCGCTTATCC	TGACTGGACGAAACCAAGAA	94640	95116
ndhBex2-2	TTCTATAATTTTCGATGTGAGGG	TCATTGCTATTACTCAAACAAGCA	95069	95545
ndhBex2-in	TCCGATTTGACCTATGGACG	GTGCTCCTACGGAACCAAGG	95481	95969
ndhBex2-in-ex1	CCAGAAGAAGATGCCATTCA	TCATCAATGGACTCCTGACG	95582	96418
ndhBin-ex1	GGAATCCTTCATCAGTGGTTG	GAAGGAGTGGCGTTTCGTTT	95899	96393
ndhBex1-1	TCTCAGAGATAGATAGAGAGGTAGGAATTT	CATTGAATGTACAGAAATGGCTATAA	96342	96811
ndhBex1-2	AAACATTCCTCCTAGAGTAGCTGTAAT	TTCCGTAATATTCCATTCCAAA	96739	97234
IG-rps7	TCATGAATTAGTAACTGCATCAA	CACTTGCCATTCGTTGGTTA	97161	97653
rps7-rps12ex3	TGAAAGCCATATTTTCGACCC	CGTATGTACGGTTTGGAGGG	97591	98076

PCR-Produkt	Primer 1	Primer 2	Genomposition	
			Start	Ende
rps12in2-ex2	CCCATATTGTAGGGTGGATCTC	CTAGAAACATGTGAAGTGTATGGCT	98017	98505
rps12ex2	GTCTCGTGGTAGCTGCTC	GAGGAGATTTCGCGAACGA	98430	98923
rps12in1	ACCTCATACGGCTCCTCGTT	AATCTGATTGAATTTATTTCTGACCC	98855	99352
IG rps12-V-GAC-1	TTTCTCATTGAGCGAAGGG	CGGTTCGGTTGCTACTGC	99310	99749
IG rps12-V-GAC-2	GATCCGATCAATTGCGTAAA	TCATAGTAATAGAAAATACATGTCCTACCG	99708	100124
IG rps12-V-GAC-3	AGTCCTACATTTTGTCTCTGC	CTATTTCCAAAGGAAGTGGAGTTAC	99882	100309
IG rps12-V-GAC-4	GACATGTATTTCTATTACTATG	CGGAAATAGGATTGACTACG	100102	100540
IG rps12-V-GAC-5	AAATAGGAAGATCTTTGGCG	ATCCTAAGTCAAAGGGTCTGA	100304	100681
V-GAC	AGATCGGGAGAATCGTACGG	TCATAACTTGATCCATGCG	100470	100940
V-GAC-16S	TAACTCAGCGGTAGAGTGTG	TACGCGTTACTCACCCGTCC	100716	101121
16S-1	ACTCCATGCGAATATGAAGC	TCTCAGTCCCAGTGTGGCTG	100902	101309
16S-2	GCTCGCTGTGATTAGCTAG	CATGTCAAGCCTGGTAAGG	101214	101958
16S-3	GAAAGCACTCTGCTGGGC	GTCGCCCAGGGCATAAG	101686	102185
16S-4	TGGAGCATGTGGTTAATTTCG	CTGAAAAGGAGGTGATCCAGC	101903	102506
16S-5	AGTTCGGATTGCAGGCTGC	GGGGGCCCGCTATGCCAAGC	102258	102781
I-GAU ex1	ATTTAGGTTTGACACAGCTTC	CCACATCTCAGGGTCAGGCG	102529	102921
I-GAU ex1-in	GCACGACGGCTATTAGCTC	GAGTCAAGAGATAGATAACATG	102794	103302
I-GAU ex2	CTTATCAGTGTATGGACAGC	GGCCATCTGGATTGAACCAG	103116	103599
I-GAU-A-UGC	AGAGTTGTATGCTGCGTTTCG	CCAAC TACC GTCCATGTACG	103466	103924
A-UGC ex1-in	TGCATGCTCCACTTGGCTCG	CCTACGGGGTGGAGACGATG	103645	104093
A-UGC -in	GGTCAGATCTAGTATGGATCG	ATAGAGGCCAACGATAGACAAG	103886	104460
A-UGC ex1	GTTCTGTTTCTCTGTAGC	CCTTAACTTTAAGGCTATGC	104286	104684
A-UGC-23S	GCGGTGGTTTACCCTGTGGC	CCGCTTCGCTAGCAGCACG	104487	105004
23S-1	GAAGTCTGCTGAATCCATG	AAGCCACTGCCTATGAGTCG	104822	105303
23S-2	CCGATAGCGAAGTAGTACCG	GTCATATCTAGTATTGAGAG	105146	105630
23S-3	GGAGTCCGAACCGACTGATG	CCCACAGCTTCGGCAGATCG	105426	105881
23S-4	GGGGATAAGCTTCATCGTCG	ACCATCTTTCGGCTAACCTAGC	105671	106168
23S-5	AGCGAGAATGTCGGCTTGTG	ACGACTTTCGGGAGACCTGTG	105958	106509
23S-6	GAAACCGACACAGGTGGGTA	CCTTCCACCTAAGCTGCG	106334	106833
23S-7	ATAACGGTCTTAAGGTAGCG	GGTGGGTCTTCAGTCAAGC	106621	107068
23S-8	TCAGTGAGATACCACTCTGG	GATAACTGGTACACCAGAGG	106868	107407
23S-9	GGTACGTGAGCTGGGTTTCAG	AAGTCTACCGTCTGTTAGG	107277	107697
4,5S	AGAGCCTCCGGTAGCACAGC	TCATCATCTGGCGTCGAGC	107515	108074
R-ACG-1	CTTTGGTGTCCACTCCAGTC	TCCGCTATCGCTATCCCG	107860	108448
R-ACG-2	GGGCTGTAGCTCAGAGGATT	TCCTTGATGCAGTCATCGATT	108302	108758
N-GUU-1	ATTCATATGTTTGTCTGCGG	GGGTTACGAAGGAACTTCGAG	108698	109167
IG-ycf1	AGATCTCATAGAGTCAATTCCCG	TGATACTTTCTTCGGTTCCTTC	109098	109593
3'ndhF(ycf1)	TTGTTGGTTGGTTAATTGGTCA	TGTTCGAACGTGGAATTCAT	109928	110340
ndhF-1	TGAAATGGAAGAAATCCGAGT	TTTGATATAATTGGTCATATAATCGTGG	110271	110673
ndhF-2	TGAAATGGAAGAAATCCGAGT	CCGCATGAATCAGACAATAC	110271	111021
ndhF-3	AAAGGTTTATTGACGGCGTG	TCCCATTTCCGGCTTTATACA	110874	111865
ndhF-4	TCATTAAGAATTTTCATCTTTCGACC	TCCCATTTCCGGCTTTATACA	111371	111865

Anhang

PCR-Produkt	Primer 1	Primer 2	Genomposition	
			Start	Ende
ndhF-5	GGTATCCTTGATCATGCGACATA	TCAATATTCATGGATCATCCCTTT	112275	112624
ndhF-IG	AAAGGAGAAGTCCAACCTCTAGTAAA	TTTGTCGTGGAAATCTTTGTTT	112554	113007
IG ndhF-rpl32	AAGAATAGAACAAAGATTTCCACGA	AATTCAGTGGTATAATTGGATGTCA	112979	113433
rpl32	TGTCTTTGACATCCAATTATACCAC	TGTCTCAAGGTAGTGATGGGAA	113402	113792
IG rpl32-ccsA	GGGATTCGTATTGTTCCCATC	AATTAAGTAGTTGGAACCTCAACCC	113758	114107
IG-ccsA	TTTGCTTTGGGTTGAAGTTCC	TTGTCAGCACAAATTGAAACGA	114073	114530
ccsA	GGTTAATGATGCACGTAAGTATGA	AAACCGATCAAAGCCACAAT	114873	115365
ccsA-ndhD	GGTATAAATCTGCAATTGTGGC	CCCAGAGTATTCTTTCAATC	115331	115792
ndhD-1	AGCGCAATAAATCCATGAG	GTTGCAACGAACCAACATTTAA	116139	116602
ndhD-2	AATAGTATTTCAAGTGTAACAGGATAGGA	TGGACGATCCATTAATTCAACT	116530	116998
ndhD-psaC	TCGATCCATTTATAATCTTCGGA	GACTGTGTTGGTTGAAGAGATGTG	116953	117425
psaC-ndhE	CATGCCATAAATAAATCGAACG	AAATCAATTCGCATAAACCAATC	117350	117845
ndhE	AAGGTCGATTGGTTTATGCG	TCTAGTTGATGGAATCCGGTG	117817	118178
IG-ndhG	CATTCAGCAACTCCTTATCAATTT	CTCGATACGTCATGGTACGG	118107	118562
ndhG	CTTATTAATCTTGCTCTAGAATCTGGTT	ATAATGGATTGCTGGACC	118492	118910
ndhG-ndhI	ACTAGAAGACCGGATCCCAGA	TGGGTCGTTACCAATGTCA	118846	119338
ndhI	TTTGTGAGGTTGAATTCCAAA	TGCTTCCTATGATAACCGGG	119269	119761
ndhI-ndhAex2	ACCAATATACCTTGCAGCTCG	GTTGCTTCTTATCTAAATCTATTAATTCC	119694	120158
ndhAex2-in	GGAATAGAAATATTCCAACCGC	GAATTTGAGCAGACAGAATCCA	120079	120576
ndhAex2-in-ex1	TTGACGCCACAAATCCAT	TTAGGTGGTCTGCGAGCTG	120297	121535
ndhAin-1	GGGTCCGAATTATACCAATG	GGGCTTTAAATTAGTAGAAATGATCAGA	120535	120969
ndhAin-2	ATTGTGCGGTGGATAGGAGC	TGTACAAAGGTTAAACGGAAATAAA	120891	121261
ndhAin-ex1	GGGTAAAGTGATTCTTACACTTATGTTTATT	TTCAGTAATCCCTTAGCAATCA	121212	121671
ndhAex1-ndhH	AAATACCGATATTGAGATCCGC	TGAAATGGCTGATATTATGACG	121616	122078
ndhH-1	AATAACGAGCTAATGAATCTCCTTG	AAAGGGCCAGCTATATCAGAGT	122409	122906
ndhH-2	GCCGAGCCATAACAGATGAG	TTCAGAAATCTAATTCATGCCAGA	122836	123235
rps15	TTCTGTAACTGGTCTTTCATAAGTT	AAATATAGTCATTTCAATTTGAAGAACAAA	123171	123554
rps15-IG	CCAGCAGTCGTTGACGTTT	TGCACAAATATGAGGGATTGTT	123376	123829
ycf1-1	AACAATCCCTCATATTTGTGCAT	AATTATGATTTCTTTGCCCTGAAA	123808	124219
ycf1-2	AACAATCCCTCATATTTGTGCAT	TGATTGGATGGGAATGAATG	123808	125051
ycf1-3	TCTACTTGACCGCCGATTC	CAAGAATGAAGAAAATGGAG	124779	125900
ycf1-4	AATGAAAGATTCCGTGTTCTTG	AATTTCAAGCATCTCAGAAGGC	125641	126660
ycf1-5	TTCGCTAAGTGAAGAATTTGTCC	AATTTCAAGCATCTCAGAAGGC	126215	126660
ycf1-6	TTCGCTAAGTGAAGAATTTGTCC	ATAAAGAGCCACATGGCGAG	126215	127311
ycf1-7	TTAGCCCCATATATCAAACG	ATTGTAAGAAATGAAATGTAC	127063	128119
ycf1-8	ACAGACCATTCTTATCTAAAGC	CTTTTACTAGGTAATCTAG	127863	129228
ycf1-9	ACGGTAGAGCTAGGACAGTTATTG	TTAATAGGGAACTCAAAGCG	128944	129443
N-GUU-2	TGAATGGAATGGGATATGGA	AGGACTATAGAATAAAGGATTATCCCG	129381	129837
IG N-R	CTGTGATATTTGAGAATCACCGTC	GAAGGACCTTTCCCTCCG	129769	130257
18S	AAACGGCTACCACATCCAAG	TCAGCCTTGCGACCATACTC	Chromosom 2	

Tabelle 9: Oligonukleotide und Wertetabelle des CP33B Oligonukleotid-RIP-Chips. Die grafische Darstellung der Daten (Median(*Median of Ratios* (635/532))) befindet sich in Abb. 27 und Abb. 28. Zudem sind die Genompositionen (in bp) der Oligonukleotide verzeichnet. Zur Anzahl der Replikate siehe Legende der Tabelle 5. Dargestellt sind die Mittelwerte der Median-Werte der hintergrundbereinigten (635 nm und 532 nm) Fluoreszenzen aus vier RIP-Chip-Analysen von CP33B (= max. 48 Replikate) und drei der Kontrollen (=max. 36 Replikate). Grau hinterlegt sind Oligonukleotide mit denen der *Microarray* im Laufe der Studie erweitert wurde und von denen daher weniger Replikate vorhanden sind (max. 24 bzw. 12 Replikate). Die Normalisierung der Median(*Median of Ratios* 635/532) erfolgte auf die Summe aller F532-Werte, ausgenommen der F532-Werte für *psbA*.

Name	Sequenz der Oligonukleotide	Genomposition		Anzahl d. Replikate		Median(F635 Median - B635)		Median(F532 Median - B532)		Median(<i>Median of Ratios</i> (635/532))	
		Start	Ende	CP33B	Kontrolle	CP33B	Kontrolle	CP33B	Kontrolle	CP33B	Kontrolle
psbA-1	taggaataattttccaatcatatgaatcagattgaatcagatccgtag	1667	1716	48	27	68	9	79,5	90	1,27	0,20
psbA-2	atagccatgtcaaccaatgtaaaatggataagatccttttagtttagatt	1547	1596	36	33	59,5	14	89,5	85	0,86	0,28
psbA-3	gagcttgattgaaacagtataacatgacttatatagccatgtcaaccaa	1514	1563	48	33	111	25	96	94	1,69	0,20
psbA-4	gcgcaaaattctctaagtagataaattgagagcttgattgaaacagtat	1485	1534	48	30	40394	1313,5	7315,5	25633,5	5,64	0,06
psbA-5	tttatttaataatcagggtataactccaagcgcaaaattctctaagta	1459	1504	48	33	29363	1413	7950,5	27299	4,85	0,06
psbA-6	ctaaaattgcagtcagtgtaaaatcctggtttatataatcagggtga	1429	1476	48	33	28292,5	2104	5956	28785	6,53	0,07
psbA-7	aagcgacccatagggcttctgcttgcgctctctaaaattgcagtcatt	1395	1444	48	30	44462,5	2041	6804,5	35430,5	7,46	0,06
psbA-8	taaggtagggatcataaaaacacaaacctcaatgtaaaagcgggttt	1322	1371	48	33	39141,5	1153	5379	19246	6,86	0,07
psbA-8a	actggaggagcagcaatgaatgcgataataaaaacagaagtgcggtcaa	1272	1321	24	12	14389,5	1325,5	5979	15505	2,91	0,09
psbA-9	cacgaataccatcaatctactggaggagcagcaatgaatgcgataata	1252	1301	48	33	32427,5	2353	7123	30672	4,81	0,10
psbA-9a	ggcaccggaaataatattgttccgtaaagaagatccagaaacaggtt	1202	1251	24	12	7463,5	1546	7606	18948	1,89	0,08
psbA-9b	tcccagattgggtaaaatgcaatccaatgctgcagaagtaggaataat	1152	1201	24	12	19085	1642	6884,5	21050	3,87	0,08
psbA-9c	ttagttcataaggaccgctgtatagccattcatcaacggatgcagct	1102	1151	24	12	11171	2530,5	7021	27748,5	7,14	0,09
psbA-9d	ccactcacgaccatatacaagctacaccaagtaaaagttagaacia	1052	1101	24	12	24155,5	2220,5	10961,5	25620	4,43	0,09
psbA-10	aggacgcataaccagacggaactaagtcccactcagaccatataac	1022	1071	48	30	30714	1757	3589	28843	12,85	0,07
psbA-10a	aaaaacagcagtcgagctgcaacaggagctgaatatgcaacagcaatcca	972	1021	24	12	9143	1447,5	4228	16924	3,02	0,09
psbA-10b	ctagaggcataccatcagaaaaactccctgaccaattggatagatcaag	922	971	24	12	25687	2615,5	7574	26056,5	4,73	0,10
psbA-10c	gttggtctcagcctggaatacaatcataaagtgaaagtaccagagattc	872	921	24	12	16756,5	1650,5	6521	20020	5,80	0,08
psbA-10d	ccgccgaatacaccagctacacctaactgtgaaatgggtgcataagaat	822	871	24	12	21139,5	1975	6143	23275	5,58	0,09
psbA-10e	tgatcaaaactagaagtaccagaacatgcatgactaaaaaggag	772	821	24	12	17021,5	2277	6088,5	23926,5	4,66	0,10

Anhang

Name	Sequenz der Oligonukleotide	Genomposition		Anzahl d. Replikate		Median(F635 Median - B635)		Median(F532 Median - B532)		Median(<i>Median of Ratios</i> (635/532))	
		Start	Ende	CP33B	Kontrolle	CP33B	Kontrolle	CP33B	Kontrolle	CP33B	Kontrolle
psbA-11	cattagcagattcattttctgtggttccctgatcaactagaagtacc	742	791	48	33	29557,5	1105	5638,5	21516	6,57	0,06
psbA-11a	agcagctacaatgttgaagtcttcttcttcccgaatctgtaacctt	692	741	24	12	35475	5512,5	8766	53834,5	7,66	0,11
psbA-11b	gaattgtgaaactagcatattggaataatcaatcgccaaaataaccgtg	642	691	24	12	5377	2866	3421,5	29905,5	13,38	0,10
psbA-11c	accaaatacctactaccggccaagccgctaagaagaaatgtaaagaacga	592	641	24	12	33079,5	3175	3191	31380	16,73	0,10
psbA-11d	atgaaaccatttaggtgaaagccatagfactaataacctaagcagtaa	542	591	24	12	27589	3315,5	3255,5	34282,5	11,23	0,10
psbA-12	tccttgactatcaactactgattggtgaaattgaaccatttaggtgga	512	561	48	33	27935,5	1120	2757,5	19581	12,11	0,06
psbA-12a	cggttaataatcagcccaagtattaataacacgccttgactatacaac	477	526	24	12	30931,5	3680,5	3929,5	40838	18,35	0,09
psbA-13	tacgttcagcataactccataccaaggttagcacggttaataatataca	442	491	48	30	46157	1372,5	2605	32042	13,87	0,06
psbA-13a	aacagcagctagctctagaggggaagttgtgacattacgttcagcataa407	407	456	24	12	7107,5	1765	3836,5	19696	13,95	0,09
psbA-14	acactaacgaattatccattgtagtagggagcccaacagcagctaggtc	372	421	48	33	32304,5	1594	2694,5	26739	13,85	0,06
psbA-15	aagaagccttatattgctcgtttttactaaactagatctagactaacac	326	375	48	30	26378	490,5	3812,5	12585	5,88	0,06
psbA-16	acgagtaataagccctcttcttatttaaaagagccttatattgctcg	296	345	48	33	670,5	32	203	461	5,31	0,07
psbA-17	ataaaaattgctcattttatagaaaaaacgagtaataataagccctct	266	315	48	33	1204,5	48	310,5	730	4,40	0,06
psbA-17a	ttattattattattataataataataaagtaaaatataactctct	216	265	23	12	697	27	141	414	4,92	0,08
psbA-18a	tagcaaatccacctatttttttctaataaaaaatataagtaatttt	156	205	23	12	89	20	120	281	0,81	0,09
psbA-19	tgaaccgcgatggtgaattcacaatccactgccttaaccactggccta	20	69	48	33	1420,5	1570	31671	27725	0,07	0,06
rps14	tttccaattttgctcttcttctccctataatacaaaactttctttgce	37188	37237	48	30	517	66,5	884	777,5	0,883	0,0685
rsp14-psaB	aataaataaagagtgcatacctatattttttataaaaaaatatata	37300	37349	48	30	120	18,5	174	153,5	0,6735	0,1215
psaB1	ttaaccgaattgcccgatgtggaggcaatcaagaagccgcataagtgga	37375	37424	48	30	226,5	38,5	408	530,5	0,7795	0,0785
psaB2	atatcattgataagttgtgaagagtttaaccatagataatcttaacc	37675	37724	48	30	484,5	73	959,5	892,5	0,6185	0,0815
psaB3	tactaagatcaatgtattgtatgtaaacctaaagcaatagcatgatgaa	37975	38024	48	30	408,5	67	731,5	798	0,786	0,0795
psaB4	tcccaagatggaaccctagaagaggtggcccaactaaatgggata	38275	38324	48	30	124	27,5	254,5	287	0,6015	0,1045
psaB5	gcctaattgaaaatgaatcgaattattgattgtgcataaagacccttat	38575	38624	48	30	402	64,5	759,5	964	0,5465	0,068
psaB6	ttgagcataaagattccactgaccctgaaaaagtgggcctaaccctggg	38875	38924	48	29	343,5	59	767,5	856	0,5465	0,07
psaB7	aagatctcattagctacgtaaacaggattgtataaccactgataaacac	39175	39224	48	30	404,5	60	763	802,5	0,739	0,08
psaB8	atcatgactctcgaagctatgctggtagcaataccaaccaataacgac	39475	39524	48	30	272,5	45	378,5	487	0,8335	0,092
psaB-psaA	ttggctaaacctggaaatcttaatgccataatgccttcaaatctcc	39550	39598	48	30	484,5	72,5	694	744	0,872	0,0725
psaA1	tagccattactctacataattcttctaagaagaacgcccatggt	39605	39647	48	30	422,5	69,5	723,5	742	0,7775	0,0775

Name	Sequenz der Oligonukleotide	Genomposition		Anzahl d. Replikate		Median(F635 Median - B635)		Median(F532 Median - B532)		Median(<i>Median of Ratios</i> (635/532))	
		Start	Ende	CP33B	Kontrolle	CP33B	Kontrolle	CP33B	Kontrolle	CP33B	Kontrolle
psaA2	tgccataagaatcgcggagccaccattaatagtaatggaactctgtg	39905	39954	36	24	311,5	53,5	416	467,5	0,753	0,124
psaA3	accttcaacagatcaataaccgacatgaattgaaatgcatgaat	40205	40254	48	36	505	75,5	867	692	0,7415	0,0945
psaA4	acccaaactgtggaagcctagaatatacataccagttgagatgtgata	40505	40554	48	36	341	60	640,5	484,5	0,828	0,104
psaA5	agataattgagcatgccatgatgtttagaattcatatagcccttat	40805	40854	48	34	299,5	49	629	469	0,5715	0,0955
psaA6	ataaagttagccaaaagatcccagttcaagataaattcatgaggaagcg	41105	41154	48	33	177,5	41	368,5	294	0,5935	0,095
psaA7	agttattccggatgctgccaaatctgaaaaagcctgaggttattgta	41405	41454	48	33	211,5	39	412	396	0,626	0,117
psaA8	agcatgtaggtccagatccaagtgtgtagtcatggctcccttagctattg	41705	41754	48	33	393	65	693,5	717	0,6375	0,09
psaA-IG	gaataatcattgagctcctcttccggacaacacatacaaaagaaacc	41848	41896	48	33	315,5	61	749	678	0,596	0,089
psaA-410	attatcctattcaataaactgattatgctactactaagaaaaagctca	42217	42266	40	28	49	17	63,5	57,5	0,7545	0,4345
ndhB-1	aaaaaaaccaattttggattttggaatggaatattacggaatccccat	97241	97192	48	33	71,5	21	323	249	0,362	0,089
ndhB-2	attctcgtagaatcgagaatgaaatttcattctgacatgccagatcat	97164	97115	48	33	73,5	18	247,5	187	0,442	0,158
ndhB-3	atcggaacaatagggccgttatgctcattacgaaactgttgaagatg	96979	96930	48	32	83,5	20	251	170	0,5355	0,147
ndhB-4	ttccctagtagctgttaatatgaaataacagaaactctgttatagcc	96793	96744	48	33	66,5	26	238	186	0,3645	0,122
ndhB-5	tagccaagagaacctgaaccagaataagaagcttgcaccaccatga	96611	96562	48	30	94	19,5	332	326,5	0,323	0,0845
ndhB-6	tcctctgatactgcaggagtcattgatgagaagggctagggaagct	96437	96388	48	30	31,5	10,5	117	94	0,425	0,1775
ndhB-8	tagagagtaggaattctcaaacgaaccgactcctctgatactgcag	96404	96355	45	30	32	11	124	92,5	0,393	0,199
ndhB-9	gcatgcatagagtttgaaaaatccaaactcagagatagatagag	96359	96310	44	30	27	13,5	116,5	90	0,5025	0,1685
ndhB-10	gtcaaaagtctgtctgctcgtgggatagcattctctctgcatg	96314	96265	48	30	82,5	16,5	127	104,5	0,6805	0,162
ndhB-11	ttcgtgttctgacctctcacttaattgttattgaacaagtcaa	96269	96220	48	30	49	11,5	160	143,5	0,495	0,1195
ndhB-12	ccgtaatacaaaactgcaaaatggatccgttatcataaagagattcgt	96224	96175	46	30	35	12,5	119	86,5	0,674	0,2225
ndhB-13	gtcttctgtatactgattagtcgatcctttgcaggaactaccgta	96179	96130	47	30	49	16,5	139	129	0,542	0,132
ndhB-14	tgaaggatgagaaccaactatgtagcatcatcagagaattcaagtctt	96134	96085	47	30	47	17,5	139	152	0,54	0,154
ndhB-15	ggtgatcctttgtgacggatgctcctattacactcgtagtctctgaag	96089	96040	47	30	33	15,5	132	122,5	0,469	0,1415
ndhB-16	atctgattgattcgtctcaatagccatgagattatcatcttagggtga	96044	95995	48	30	45,5	16	157	139	0,4995	0,1405
ndhB-17	ccttggttccgtaggagcacgctccgaaagattgagaaatggaacctctg	95999	95950	48	33	63,5	33	193	141	0,4605	0,442
ndhB-18	ctcatcagtggttgaatgactgattttctcaatctttcgaccttg	95954	95905	48	33	46,5	17	132	113	0,4905	0,154
ndhB-19	tgtataagatgaatccttctatttctaaacggattactaatccttaa	95890	95841	48	33	30,5	15	105	85	0,4795	0,219
ndhB-20	agtataaaagtaaaagaactcatctcttcttttgattactttc	95832	95783	39	33	40	8	119	82	0,34	0,206

Anhang

Name	Sequenz der Oligonukleotide	Genomposition		Anzahl d. Replikate		Median(F635 Median - B635)		Median(F532 Median - B532)		Median(Median of Ratios (635/532))	
		Start	Ende	CP33B	Kontrolle	CP33B	Kontrolle	CP33B	Kontrolle	CP33B	Kontrolle
ndhB-21	caaaaccgtgcatgagactttcatctcgcacggctcctaagtataaaag	95793	95744	48	33	28,5	10	98	88	0,4345	0,254
ndhB-22	gtcagagtcgaaaaggaggtctcactctttctcattcaaaaccgt	95752	95703	48	33	38	17	134,5	129	0,497	0,155
ndhB-23	tccgattggacctatggacgaatatgaagcatacgtttcatgcttgtt	95530	95481	48	33	92,5	29	350	341	0,3725	0,09
ndhB-24	gagctaagagagagccaaaaaggatctttgtgtataatcctgcataa	95331	95282	48	33	49,5	15	157	118	0,4725	0,156
ndhB-25	taataactgattatftttgataatagtagatagaagaacgctcgtaa	95167	95118	47	33	54	22	220	186	0,439	0,134
ndhB-26	ctagaagctaaaaaggatctctgagcaatcgcaataatcggttcattg	94990	94941	48	33	49,5	15	171	116	0,4785	0,205
ndhB-27	cattttggcggaaccgatctactaattctttgattccagtagtattag	94910	94861	48	33	59,5	25	221,5	218	0,425	0,132
ndhF-20	ctcgaagttcttcgaacccccggaacttctctgtagtgctccggtc	109146	109195	48	30	143	67,5	1144,5	849	0,1665	0,07
ndhF-19	tgtgatggttttcaacttttatactagtaactagtagtattatgca	109404	109453	48	30	38,5	16,5	187,5	136,5	0,3375	0,129
ndhF-18	accacattttccataggcctctcttctctctccgactcgggt	109504	109553	45	24	19	16	95	75	0,315	0,2145
ndhF-17	gtttattgcccagcagctcatgatgttcatactgatctattatgcgct	109604	109653	48	30	29	13	173	133	0,307	0,1235
ndhF-16	gtatcttttttcttctctggaacaatcacaacactttttgatt	109704	109753	48	30	38,5	17	164	139	0,313	0,1365
ndhF-15	ttctgaataatctcattttcaattatcaacattctttaccag	109804	109853	48	30	34,5	18,5	135	111	0,3615	0,178
ndhF-VL	agtcaacatttatgtttcgatgcaacaacaagattattgtaacaa	109872	109921	48	30	31,5	11	186	99,5	0,3505	0,178
ndhF-14	agatgttattgtaacaagtagttttggttggttaattggtcacatt	109904	109953	48	33	107,5	25	515,5	258	0,434	0,106
ndhF-mature	gtagtttgggtgggttaattggtcacattttatcatgaaatgggt	109922	109971	48	30	72	16	298,5	150,5	0,341	0,142
ndhF-13	gcaaaataattctattaggctaatgtatttagatctataaagtat	109995	110044	48	33	53	22	170	126	0,409	0,172
ndhF-12	ctcttattttacgtgtctactatttaggcagaataccatcacccat	110095	110144	48	33	110,5	29	478,5	471	0,2815	0,1
ndhF-11	accaagaggtaccaccgaaagaagctctttctctctttttcggaa	110195	110244	48	32	300,5	151,5	3364,5	3193	0,1515	0,0555
ndhF-10	tggaaaagacaaaataaaggatgatgaattccacgttcgaacatact	110295	110344	48	33	67,5	24	462,5	344	0,285	0,077
ndhF-9	aagaaaattcgaatttagaattttcaaaataaaaaaaaggatcat	110384	110433	36	24	26	9	63,5	54,5	0,5025	0,3325
ndhF-8	aattaagtaaggtaaaattataaagaatgaataaaaggcttatataaa	110724	110773	48	33	35	10	139,5	85	0,531	0,218
ndhF-7	tttttataagttttttctctcttaccataaagagagtgaata	111170	111219	47	32	36	11,5	124	81,5	0,5	0,2405
ndhF-6	gatcctaaaacaacaagcttcgaataagcatgagtaatacaatgaa	111560	111609	48	33	54	14	251,5	127	0,4155	0,152
ndhF-5	atagaaatgcacacaaagtaaggaataagagatttactctattttaaa	111942	111991	48	33	44	10	207	94	0,4255	0,191
ndhF-4	acataaattgactactataatcagaacaaaatccaacagtgttaatt	112293	112342	46	33	34	13	137,5	61	0,5525	0,294
ndhF-3	tgatccatgaattatgatgtgtccataaaataaaaaatccttttt	112608	112657	43	33	26	11	95	77	0,433	0,286
ndhF-2	ttgtgatttatgcaataacagaaaagtgaattataatccatattaca	112909	112958	48	30	18	7	85	66	0,3905	0,234

Name	Sequenz der Oligonukleotide	Genomposition		Anzahl d. Replikate		Median(F635 Median - B635)		Median(F532 Median - B532)		Median(<i>Median of Ratios (635/532)</i>)	
		Start	Ende	CP33B	Kontrolle	CP33B	Kontrolle	CP33B	Kontrolle	CP33B	Kontrolle
psbD-prom	ctttttgcgtgtattaataactgtctattaataactatagatcaact	122110	122159	48	30	475	26,5	747,5	640,5	0,723	0,0565
psbD-IG	tggtaaatttaccaggctatagtcattagcgatcctctattc	121742	121784	48	30	694	52	1113,5	935,5	0,7625	0,0685
psbD2	gcacatgaatagcgcatagcagagccgcgccagtacaccggcgactcc	121119	121168	48	30	305,5	46	688	703,5	0,762	0,073
psbD3	gtatagaaaagtctcaaattctggatctccgctgcacggattctctggga	120819	120868	48	30	1347	115	2532	2231,5	0,769	0,072
psbD-psbC	agctaaagttaaagagcgtttccacgtggtagaacctctcagggaaat	120694	120748	48	30	749	83	1106,5	1038,5	0,7875	0,081
psaJ	aatgcatctggaataaacgattaatctctattataaacctgctaacga	87441	87490	48	33	338,5	90	4413,5	2386	0,134	0,072
trnF	atttgaactggtgacacgaggatttcagtcctctgctctaccaactgag	106245	106294	48	33	245	868	15360	18463	0,041	0,066
trnT				48	30	234	294,5	6785	5507	0,0545	0,068
trnL(CAA)_s				48	30	537	991	20361,5	22864	0,039	0,044

Anhang

Tabelle 10: Vergleich der qRT-PCR Daten der *cp33a*-Mutanten versus Spectinomycin-behandelten Pflanzen. Die abgebildeten Werte von *cp33a*, Spec und deren Standardabweichungen (SD) sind jeweils die Quotienten zu den Wildtypdaten. Hellgrau hinterlegt sind Transkripte mit ähnlichen Transkriptmengen zwischen *cp33a* und Spec, so überlappen deren Standardabweichungen, $(cp33a+SD) - (Spec-SD) > 0$. Dunkelgrau hinterlegt sind Transkripte, die in den *cp33a*-Mutanten gegenüber den Spectinomycin-behandelten Pflanzen zweifach stärker reduziert sind, $cp33a/Spec < 0,5$.

Transkript	<i>cp33a</i>	Spec	SD <i>cp33a</i>	SD Spec	$(cp33a+SD) -$ $(Spec-SD)$	<i>cp33a</i> / Spec
<i>psbA</i>	0,0075	0,0084	0,0026	0,0035	0,0052	0,8912
<i>matK</i>	1,5969	2,8421	0,1956	0,3547	-0,6948	0,5619
<i>rps12A</i>	0,8519	0,9170	0,1611	0,2288	0,3247	0,9290
<i>psbK</i>	0,1562	0,2331	0,0410	0,0673	0,0315	0,6702
<i>psbI</i>	0,3681	0,3852	0,0979	0,0859	0,1667	0,9557
<i>atpA</i>	0,2078	0,6073	0,0449	0,0809	-0,2737	0,3422
<i>atpF</i>	0,0747	0,1565	0,0304	0,0253	-0,0261	0,4771
<i>atpH</i>	0,1324	0,3863	0,0261	0,0526	-0,1753	0,3426
<i>atpI</i>	0,3167	1,0533	0,0628	0,1435	-0,5303	0,3007
<i>rps2</i>	0,9665	3,0898	0,1622	0,7506	-1,2105	0,3128
<i>rpoC2</i>	1,6609	6,1828	0,2742	1,6731	-2,5746	0,2686
<i>rpoC1</i>	0,5851	2,1558	0,1810	0,7643	-0,6254	0,2714
<i>rpoB</i>	1,0951	4,5005	0,2586	1,2794	-1,8673	0,2433
<i>petN</i>	0,1320	0,4393	0,0241	0,0463	-0,2369	0,3005
<i>psbM</i>	0,0765	0,1702	0,0185	0,0446	-0,0305	0,4495
<i>psbD</i>	0,0387	0,1103	0,0119	0,0326	-0,0271	0,3508
<i>psbC</i>	0,0284	0,0671	0,0101	0,0237	-0,0049	0,4239
<i>psbZ</i>	0,0988	0,1664	0,0381	0,0660	0,0366	0,5938
<i>rps14</i>	0,3733	0,4069	0,1611	0,1570	0,2846	0,9174
<i>psaB</i>	0,0781	0,2467	0,0260	0,0819	-0,0607	0,3164
<i>psaA</i>	0,0755	0,2266	0,0237	0,0716	-0,0558	0,3330
<i>ycf3</i>	0,4458	0,7834	0,1425	0,3369	0,1417	0,5690
<i>rps4</i>	0,5707	1,4320	0,1380	0,3793	-0,3440	0,3985
<i>ndhJ</i>	0,1048	0,2548	0,0105	0,0263	-0,1132	0,4114
<i>ndhK</i>	0,0859	0,2348	0,0106	0,0209	-0,1174	0,3659
<i>ndhC</i>	0,0802	0,2340	0,0149	0,0299	-0,1090	0,3427
<i>atpE</i>	0,3716	0,8342	0,0890	0,1351	-0,2385	0,4455
<i>atpB</i>	0,3048	0,7763	0,0682	0,1388	-0,2645	0,3926
<i>rbcL</i>	0,0225	0,0653	0,0072	0,0240	-0,0115	0,3452
<i>psaI</i>	0,3740	0,8311	0,1042	0,2155	-0,1374	0,4500
<i>ycf4</i>	0,4946	1,2516	0,1131	0,3936	-0,2503	0,3952
<i>cemA</i>	0,5888	1,4264	0,0723	0,1707	-0,5946	0,4128
<i>petA</i>	0,3746	1,0090	0,0525	0,1114	-0,4705	0,3712
<i>psbJ</i>	0,0960	0,2590	0,0320	0,0861	-0,0450	0,3706
<i>psbL</i>	0,0476	0,0810	0,0140	0,0277	0,0082	0,5870
<i>psbF</i>	0,0547	0,1064	0,0181	0,0332	-0,0003	0,5142
<i>psbE</i>	0,0495	0,0925	0,0159	0,0276	0,0005	0,5348
<i>petI</i>	0,3810	0,7641	0,0720	0,1325	-0,1786	0,4986
<i>petG</i>	0,4705	0,7048	0,0909	0,1211	-0,0223	0,6676

Transkript	<i>cp33a</i>	Spec	SD <i>cp33a</i>	SD Spec	(<i>cp33a</i> +SD) - (Spec-SD)	<i>cp33a</i> / Spec
<i>psaJ</i>	0,1016	0,2418	0,0300	0,0675	-0,0427	0,4200
<i>rpl33</i>	0,3710	0,7793	0,0763	0,2197	-0,1123	0,4760
<i>rps18</i>	0,7718	1,4475	0,0878	0,2891	-0,2988	0,5332
<i>rpl20</i>	1,7223	4,8784	0,4246	1,2782	-1,4533	0,3530
<i>clpP1</i>	1,7636	3,5070	0,2297	0,5282	-0,9856	0,5029
<i>psbB</i>	0,0472	0,2603	0,0144	0,0831	-0,1157	0,1812
<i>psbT</i>	0,0352	0,2204	0,0109	0,0868	-0,0874	0,1599
<i>psbN</i>	0,0144	0,0413	0,0046	0,0152	-0,0070	0,3500
<i>psbH</i>	0,0790	0,2723	0,0241	0,0840	-0,0852	0,2901
<i>petB</i>	0,0770	0,4331	0,0098	0,0576	-0,2887	0,1777
<i>petD</i>	0,1250	0,5347	0,0175	0,0589	-0,3333	0,2337
<i>rpoA</i>	0,9212	3,3019	0,2305	0,8506	-1,2997	0,2790
<i>rps11</i>	1,2680	5,3351	0,2914	1,1431	-2,6326	0,2377
<i>rpl36</i>	1,2801	5,1767	0,2578	1,0785	-2,5603	0,2473
<i>rps8</i>	1,2381	5,4177	0,3484	1,6453	-2,1860	0,2285
<i>rpl14</i>	0,8726	3,1169	0,2547	1,0957	-0,8939	0,2799
<i>rpl16</i>	0,9883	3,2045	0,3035	1,1578	-0,7549	0,3084
<i>rps3</i>	1,0246	3,5436	0,3073	0,9490	-1,2628	0,2891
<i>rpl22</i>	1,0128	4,0727	0,3796	1,3148	-1,3655	0,2487
<i>rps19</i>	1,2018	3,2831	0,3307	0,9467	-0,8039	0,3661
<i>rpl2</i>	0,3591	0,4399	0,0992	0,1474	0,1659	0,8165
<i>rpl23</i>	0,2868	0,8311	0,0654	0,2338	-0,2450	0,3452
<i>yef2.1</i>	1,2559	2,4046	0,2343	0,6898	-0,2247	0,5223
<i>rps7</i>	1,0087	1,7915	0,2763	0,7211	0,2145	0,5630
<i>yef1</i>	0,3944	1,3092	0,1116	0,4790	-0,3242	0,3012
<i>ndhF</i>	0,5279	1,6209	0,1090	0,2129	-0,7711	0,3257
<i>rpl32</i>	0,3549	0,6787	0,0768	0,1789	-0,0681	0,5230
<i>ccsA</i>	0,8033	1,8066	0,2046	0,2169	-0,5817	0,4447
<i>ndhD</i>	0,3773	0,9700	0,0400	0,0671	-0,4857	0,3889
<i>psaC</i>	0,0993	0,1953	0,0320	0,0719	0,0080	0,5085
<i>ndhE</i>	0,1554	0,3772	0,0302	0,0394	-0,1521	0,4120
<i>ndhG</i>	0,2111	0,5569	0,0349	0,0843	-0,2266	0,3790
<i>ndhI</i>	0,2348	0,7764	0,0304	0,0784	-0,4328	0,3025
<i>ndhH</i>	0,7981	3,7139	0,1187	0,3383	-2,4588	0,2149
<i>rps15</i>	1,3771	5,2243	0,3089	1,3199	-2,2184	0,2636
<i>rRNA 16S</i>	0,0173	0,0211	0,0059	0,0070	0,0091	0,8203
<i>rRNA 23S</i>	0,3475	0,3245	0,1027	0,1112	0,2368	1,0708

Tabelle 11: Primersequenzen und Wertetabelle der quantitativen *Real-Time* PCR der *cp33b*-Mutanten. Die grafische Darstellung der Daten ($\text{Log}_2 \text{ cp33b/Col-0}$) befindet sich in Abb. 21. Die p-Werte wurden durch einen ungepaarten Zweistichproben-t-Test (zweiseitig) ermittelt. Das Transkript für Actin wurde sechsmal analysiert und zur Normalisierung verwendet, wodurch die Log_2 Verhältnisse Null sind. SD = Standardabweichung.

Gen	Primer 1	Primer 2	Log ₂ (<i>cp33b</i> / Col-0)	SD	p-Wert
<i>psbA</i>	GAGCAGCAATGAATGCGATA	CCTATGGGGTCGTTCTGTGA	-0,459	0,387	0,075
<i>matK</i>	ATCCTTTGTTGCCAGAATGC	TTTTTCTACGCAAGCGGTCT	0,540	0,425	0,124
<i>rps12</i>	TCTCACACCGGGTAAATCCT	ATCCGAAACGTCACGAAATC	0,323	0,258	0,063
<i>psbK</i>	AGGCCTACGCCTTTTGAAT	CGAAAACCTACAGCGGCTTG	0,257	0,436	0,219
<i>psbI</i>	TTTCTCTTTCATATTTGGATTCT	TTCTTACAGTCCCGGATTAC	-0,103	0,261	0,118
<i>atpA</i>	CGGAAATCTTACCTCGACCA	TTTTGCGCAGAGTCAATACG	0,264	0,491	0,469
<i>atpF</i>	GCTCCTTACAGCAGTTCTTC	TACTTGGGTCAGTGGCCATC	0,250	0,526	0,542
<i>atpH</i>	ATCCACTGGTTTCTGCTGCT	TTCTTCTGCCTCAGGTTGT	0,190	0,500	0,604
<i>atpI</i>	ATTGGCAAATAGGGGGTTTC	GCCGTCAGTTGGAATTGTTT	0,165	0,464	0,593
<i>rps2</i>	GGGCTCGGTGTCATTATGTT	TCTTCAACACAGCTGCATCC	0,603	0,322	0,066
<i>rpoC2</i>	ATGGAGCCCGTAAAGGAGTT	CGTCTGCTAAGACACGACCA	0,719	0,356	0,063
<i>rpoC1</i>	TCGGATACGAAGATATCAAATGG	TTAGTTATGGGCTAGCAAAAAGA	0,703	0,380	0,047
<i>rpoB</i>	AAAAAGCACGGATACGGATG	CTTCTGAATGCCCGGATTA	0,652	0,367	0,055
<i>petN</i>	CGCATGGGCTGCTTTAAT	GAGTCCACTTCTTCCCCACA	-0,294	0,381	0,478
<i>psbM</i>	TGCACTCTTATTCTCGTTCC	TCATTTTGACTAACGGTTTTTACG	0,068	0,463	0,598
<i>psbD</i>	CACAAATCTTTGGGGTTGCT	CCATCCAAGCACGAATACCT	-0,128	0,413	0,663
<i>psbC</i>	ACTTCCCCACTTAGCCACTT	AGCCCAAACTGCAGAAGAA	-0,229	0,411	0,433
<i>psbZ</i>	TGCTTTCCAATTGGCAGTTT	GTTACTCGACCAACCATCAGG	0,218	0,487	0,356
<i>rps14</i>	AATCCCCACCGCGTAATAGT	AACATGCCTGAACCATTTC	0,296	0,297	0,131
<i>psaB</i>	GGACCCCACTACTCGTCGTA	ATTGCTAATTGCCCGAAATG	0,052	0,445	0,875
<i>ycf3</i>	TCCAATACTACGCGGCTTG	TTCGGGCATTAGAACGAAAC	0,433	0,460	0,185
<i>ndhJ</i>	CGTTTTCTGGGTTTGAAAA	AGGCCACCCTATCCAACCTCT	0,066	0,532	0,803
<i>ndhK</i>	GCAGTCCGCATATTGGAAT	CGTGGGACGATACTGGACTT	0,212	0,567	0,565
<i>ndhC</i>	TATAGAACCGATCGGGGATG	AACTCATTGCCACGGATAC	0,106	0,472	0,828
<i>atpE</i>	TCCACAAGAAGCTCAGCAA	GTGTCCGAGCTCGTCTGAG	0,084	0,353	0,605
<i>atpB</i>	CCGTTTCGTACAAGCAGGAT	CGGGGTCAGTCAAATCATCT	0,126	0,384	0,555
<i>rbcL</i>	GTGTTGGGTTCAAAGCTGGT	CATCGGTCCACACAGTTGTC	0,189	0,577	0,577
<i>psaI</i>	ACTTACCCTCTATTTTGTGCCTTT	TGAATATGAAGAAATAAAGAAGCCATT	-0,046	0,324	0,783
<i>ycf4</i>	TTTCTATGGGATCGCAGGTC	GGAAATCCCCAACGAAAAAT	0,167	0,372	0,560
<i>cemA</i>	TTTGCCCTGGTTGATCTCTC	TTGGATCGTTCTTTGTGGA	0,239	0,564	0,601
<i>petA</i>	CAGAGGGCGAATCCATTAAA	GCCAAAACAACCGATCCTAA	0,242	0,497	0,321
<i>psbJ</i>	CTGGAAGGATTCTCTTTGG	CAGGGATGAACCTAATCCTGA	-0,099	0,193	0,453
<i>psbL</i>	CAATCAAATCCGAACGAACA	GAAATAATTCGAAAAATAAACAGCAA	0,230	0,473	0,249
<i>psbF</i>	GGACCTATCCAATTTTACAGTGC	GTTGGATGAACTGCATTGCT	-0,144	0,295	0,279
<i>psbE</i>	TGTCTGGAAGCACAGGAGAA	AACCGGTGCTGACGAATAAC	-0,168	0,292	0,217
<i>petI</i>	TTTCGGTTTCTACTAGCAGCTTT	TGCTTAGACCAATAAACAGAACTGA	0,235	0,597	0,366
<i>petG</i>	TCTAATTCCTATTACTTTGGCTGGA	CCAACCTGATCACCACGTCTG	0,507	0,545	0,108
<i>psaJ</i>	ATGGTTCGGTTCGTTAGCAG	GGGAAATGTTAATGCATCTGG	-0,153	0,326	0,343
<i>rps18</i>	CAAGCGATCTTTTCGTAGGC	AAAGTCACTCTATTCACCCGTCT	0,317	0,272	0,056
<i>rpl20</i>	TCGGAGGCGTAGAACAAAAC	CGATGAGCCGAAACTAAAGC	0,322	0,446	0,072
<i>clpP1</i>	GTCGGAGGAGCAATTACCAA	GTGATGGTTTCGCGAAGTTT	0,302	0,357	0,161
<i>psbB</i>	CGTGCAGCTTTGAAATCTGA	TAGCACCATGCCAAATGTGT	-0,414	0,312	0,031
<i>psbT</i>	GGAAGCATTGGTTTATACATTCTCT	AAATTTTAGGTGGTTCCCGAAA	-0,237	0,474	0,394
<i>psbN</i>	GGAAACAGCAACCCTAGTCG	CGTGTTCCTCGAATGGATCT	-0,104	0,430	0,466
<i>psbH</i>	TCTAGATCTGGTCCAAGAAGCA	CATTGCAACACCCATCAAAG	0,013	0,408	0,959
<i>petB</i>	ATTGGGCGGTCAAATTTGTA	AGACGGCCGTAAGAAGAGGT	0,269	0,537	0,378
<i>petD</i>	TCCTTTTGCAACTCCTTTGG	CCGCTGGTACTGAAACCATT	0,227	0,517	0,385
<i>rpoA</i>	GCGATGCGAAGAGCTTACT	CCAGGACCTTGACACAAAT	0,441	0,292	0,057

Gen	Primer 1	Primer 2	Log ₂ (<i>cp33b</i> / Col-0)	SD	p-Wert
<i>rps11</i>	TACTTGTGGATTCCGGGGTA	CAGCTCGTTGCATACCTGA	0,476	0,259	0,026
<i>rpl36</i>	AAATAAGGGCTTCCGTTCGT	CCTCGGGTTGGAACAAATTA	0,493	0,271	0,038
<i>rps8</i>	CGACCGGGTCTACGAATCTA	ATTTCTCCGCCGATTCTTTT	0,479	0,343	0,091
<i>rpl14</i>	AGCGGGGCTAGAGAATTGAT	ACTGCGGCATTGTCATCATA	0,573	0,466	0,039
<i>rpl16</i>	TGTACGACGTGGTGGAAAAA	GCATTTTGTATGCCGCTATT	0,825	0,523	0,041
<i>rps3</i>	CAATCCGTATGGGGATCCTA	GATCCATTCAACACGTGCAA	0,533	0,437	0,303
<i>rpl22</i>	AAAGCTGAGGTGAACCAAGG	TGTCCCATAGGCCTCCACTA	0,903	0,628	0,075
<i>rps19</i>	CACAATGATTGGCCATACGA	TTTGGCATGTCCTCGAAAAT	0,656	0,381	0,051
<i>rpl2</i>	CGGACCTCTCCAGAAGGTAAT	AAATGGGAAATGCCTTACCT	0,692	0,604	0,152
<i>rpl23</i>	CGGTTATTGGGAAAAATCA	TTTTAACCTTTCGGGGAGT	0,593	0,591	0,182
<i>ycf2.1</i>	TAGCCCTCGGTCTATTGGTG	GGATCCACTTTTGGGGAAT	0,254	0,326	0,122
<i>ndhB</i>	CCAGAAGAAGATGCCATTCA	TCATCAATGGACTCCTGACG	-0,006	0,390	0,971
<i>rps7</i>	AAACTGCAAAATCCGATCCA	ATGAGTTGACCCGCTACAC	0,192	0,350	0,383
<i>ycf1</i>	TTTCGGAAGAAGGGGAAGAT	TTCGAACGTGGAATTCATCA	0,114	0,393	0,603
<i>ndhF</i>	CGGCGGGTATTTTCTTGTGA	GGCTAAACCCCGCTTAATGT	0,230	0,553	0,479
<i>rpl32</i>	CTCGAAAAAGCGTATTCGTAATA	TGAAAAAGCTTCAACGATGTC	0,430	0,518	0,145
<i>ccsA</i>	CACAATAACTGCGCCAAGTG	AACAGAGCGCCATAGCCTAA	0,398	0,456	0,147
<i>psaC</i>	GAGCATGCCCTACAGACGTA	CAGGCGGATTCACATCTCTT	0,212	0,403	0,484
<i>ndhE</i>	TGGATTGATCACAAGTCGAAA	AGCGGCTGCAATTGCTATAA	0,412	0,617	0,396
<i>ndhG</i>	TTGCCTGGACCAATACATGA	ACATTTATGGCCCCACATA	0,235	0,695	0,617
<i>ndhI</i>	TTTGCTGTGTGATTGGA	ATTGGTAAACGACCCAAAGC	0,491	0,691	0,434
<i>ndhA</i>	TTGACGCCACAAATCCAT	TTAGGTGGTCTGCGAGCTG	-0,161	0,622	0,726
<i>ndhH</i>	ATGGGAAATTCATGGCAAA	TCAAAGCCCCTGCTTTCTAA	0,489	0,548	0,214
<i>rps15</i>	CAGGGGATCCGTTGAATTT	CGTTGACGTTTTCCAGAAAT	0,385	0,377	0,160
<i>rrn16</i>	CGGTATCTGGGGAATAAGCA	GATTTGACGGCGGACTTAAA	0,072	0,373	0,680
<i>rrn23</i>	GGGCGACTGTTACCAAAAA	TTACCCGACAAGGAATTTTCG	-0,057	0,264	0,417
Actin	GGTAACATTGTGCTCAGTGGTGG	AACGACCTTAATCTTCATGCTGC	0	0,319	
Actin			0	0,478	
Actin			0	0,288	
Actin			0	0,457	
Actin			0	0,207	
Actin			0	0,290	

Tabelle 12: Primersequenzen und Wertetabelle der Spleißanalyse der *cp33b*-Mutanten durch qRT-PCR. Die grafische Darstellung der Daten (Log₂ *cp33b*/Col-0) befindet sich in Abb. 22. Die p-Werte wurden durch einen ungepaarten Zweistichproben-t-Test (zweiseitig) ermittelt. Das Transkript für Actin wurde zweimal analysiert und zur Normalisierung verwendet, wodurch die Log₂ Verhältnisse Null sind. SD = Standardabweichung.

Gen	Primer 1	Primer 2	Log ₂ (<i>cp33b</i> / Col-0)	SD	p-Wert
Gespleißt					
<i>atpF</i>	GCTCCTTCACGCAGTTCCTC	TACTTGGGTCACTGGCCATC	0,250	0,526	0,542
<i>rpoC1</i>	ATTCAAATGAACCTCGTAATCGTAA	TATGGTATTTGAAACGTCTTCTAGTTAT	0,517	0,399	0,130
<i>ycf3 Intron2</i>	TCCAATACTACGCGGCTTG	TTCGGGCATTAGAACGAAAC	0,433	0,460	0,185
<i>ycf3 Intron1</i>	CGAGTCATTCGACAACCTC	TGTGGTAAAAAGGGGTTTCG	0,037	0,357	0,889
<i>rpS12 Intron1</i>	TCTCACACCGGTAAATCCT	ATCCGAAACGTCACGAAATC	0,323	0,258	0,063
<i>rps12 Intron2</i>	TTTGGCTTTTGACCCATA	CGTAAAGTTGCCAGAGTACGA	0,361	0,407	0,226
<i>clpP1 Intron2</i>	GTCGGAGGAGCAATTACCAA	GTGATGGTTTCGCGAAGTTT	0,302	0,357	0,161

Anhang

Gen	Primer 1	Primer 2	Log2 (<i>cp33b</i> / Col-0)	SD	p-Wert
<i>clpP Intron1</i>	AATAAGTTGATTTCGAGATTTCGGT	GAACCGTATGCACCAAAAAGG	0,353	0,385	0,231
<i>petB</i>	CATTGTATATTTCCGGAATATGAG	TATGTTGACATGCGGAGGAA	-0,010	0,446	0,973
<i>petD</i>	GAAGAGATAATGGATTATGGGAGT	GGGTTCCCCGTAATAATTGTG	-0,042	0,506	0,878
<i>rpl16</i>	CCAAATTTTCCACCACGTC	TCCTTTGATATAATTGCTATGCTTAGT	0,464	0,425	0,195
<i>rpl2</i>	CGGACCTCTCCAGAAGGTAAT	AAATGGGAAATGCCCTACCT	0,692	0,604	0,152
ungespleißter Vorläufer					
<i>atpF</i>	GCTCCTTCACGCAGTTCTTC	TTCGGGAAGGGATCATAGAA	0,320	0,465	0,226
<i>rpoC1</i>	TTAGTTATGGGCTAGCAAAAAGA	AACTACTTGAGCCGGATGAGA	0,384	0,361	0,106
<i>ycf3 Intron2</i>	TCCAATACTCAGCGGCTTG	AGTTGGTTGTCGAGCCGTAT	0,305	0,477	0,355
<i>ycf3 Intron1</i>	TTCGTTAAAGCGAATGACGA	TGTGGTAAAAAGGGGTTTCG	0,259		
<i>rps12 Intron1</i>	TCTCACACCGGGTAAATCCT	GGAGCCGTATGAGGTGAAAA	0,331	0,441	0,335
<i>rps12 Intron2</i>	TTGGCTTTTGACCCATA	CGTAAAGTTGCCAGAGTACGA	0,381	0,358	0,095
<i>clpP Intron2</i>	GTGATGGTTTCGCGAAGTTT	TCATTCTGCGAAATAGAAAAACC	0,503	0,361	0,068
<i>clpP Intron1</i>	AATAAGTTGATTTCGAGATTTCGGT	TTCGAAGTCTGGAGAAGGA	0,381	0,418	0,181
<i>petB</i>	TCTGGAGGGGGAGTAACCT	TATGTTGACATGCGGAGGAA	0,311	0,414	0,320
<i>petD</i>	AAAAATTATCATGTCCGGTTCC	GGGTTCCCCGTAATAATTGTG	0,238	0,388	0,282
<i>rpl16</i>	CCAAATTTTCCACCACGTC	GAAACTCTACGTTTCAGTTCTGT	0,756	0,402	0,063
<i>rpl2</i>	CGGACCTCTCCAGAAGGTAAT	GCCGTATGCTTTGGAAGAAG	0,715	0,393	0,127
Actin	GGTAACATTGTGCTCAGTGGTGG	AACGACCTTAATCTTCATGCTGC	0	0,290	
Actin			0	0,285	

Tabelle 13: Anbieterliste von Chemikalien, molekularbiologischen Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

Affymetrix	Affymetrix Inc., Santa Clara, CA, USA
Agrisera	Agrisera AB, Vännäs, Schweden
Amersham Bioscience	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
Applied Biosystems	Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA
Beckman	Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA
Biometra®	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Bio-Rad	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Biozym	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Germany
Carl Roth	Carl Roth GMBH & Co, Karlsruhe, Germany
Chemicell	chemicell GmbH, Berlin, Deutschland
Corning	Corning Inc., Acton, MA, USA
Duchefa	Duchefa Biochemie B.V., Haarlem, Niederlande
DVD	Deutsche Vermiculite Dämmstoff-GmbH, Sprockhövel, Deutschland
Epicentre	Epicentre Biotechnologies, Madison, WI, USA
Eurofins MWG Operon	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland
Fermentas	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland

Floragard	Floragard Vertriebs-GmbH, Oldenburg, Deutschland
Franz Eckert GmbH	Franz Eckert GmbH, Waldkirch, Deutschland
Gebrüder Patzer	Gebrüder Patzer GmbH & Co. KG, Sinntal, Germany
GE Healthcare	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
GenScript	GenScript, Piscataway, NJ 08854, USA
Hartmann Analytic	Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig, Deutschland
Heraeus	Heraeus, Hanau, Deutschland
Invitrogen	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
KREATECH Diagnostics	Leica Biosystems, Amsterdam, Niederlande
Life Technologies	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Merck	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Millipore	Millipore Corp., Bedford, MA, USA
Molecular Devices	Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA
National Diagnostics	National Diagnostics U.S.A., Atlanta, Georgia 30336, USA
NEB	New England Biolabs, Ipswich, MA, US
neoLab	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg, Deutschland
Novagen	Merck Chemicals Ltd., Nottingham, Großbritannien
peqLab	peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Percival Scientific	Percival Scientific, Perry, IA 50220 USA
PerkinElmer	PerkinElmer LAS (Deutschland) GmbH, Rodgau, Deutschland
Pharmacia Biotech	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
Promega	Promega Corporation, Fitchburg, WI, USA
QIAGEN	QIAGEN, Hilden, Deutschland
Retsch	Retsch GmbH, Haan, Germany
Roche	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany
Roth	C. Roth GMBH & Co, Karlsruhe, Deutschland
Scotts	Scotts International B.V., Geldermalsen, Niederlande
Serva	Serva Feinbiochemika, Heidelberg, Deutschland
Sigma Aldrich	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Stratagene	Stratagene, La Jolla, CA, USA
Thermo Scientific	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Veolia	Veolia Water Solutions & Technologies, Saint Maurice, France
Whatman	Whatman Paper, Maidstone, Großbritannien
Zymo Research	Zymo Research Corporation, Irvine, CA, USA

Abkürzungen

A	Adenin
Abb.	Abbildung
<i>A. bidest.</i>	bidestilliertes Wasser
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintri-phosphat
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserum Albumin
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
cDNA	komplementäre DNA
Ci	Curie
CoIP	Ko-Immunopräzipitation
Col-0	Columbia-0 (Ökotyp von <i>Arabidopsis thaliana</i>)
cpRNP	chloroplastidäres Ribonukleoprotein
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
CTP	Cytidintri-phosphat
dCTP	Desoxyribocytidintri-phosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtri-phosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
et al.	et altera (und andere)
g	Gramm bzw. Erdbeschleunigung
G	Guanin
GABI	Genomanalyse im biologischen System Pflanze
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
h	Stunde
hcf	<i>high chlorophyll fluorescence</i>
HCl	Salzsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethanolsulfonsäure
hnRNP	heteronukleäres Ribonukleoprotein
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
IgG	Immunglobulin G
IP	Immunopräzipitation
IR	invertierte Repetition (<i>inverted repeat</i>)
Kap.	Kapitel
kb	Kilobasenpaare
LB	<i>Lysogeny-Broth</i>
M	Mol (mol/l)
MDa	Megadalton
min	Minute
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
MORF	<i>Multiple organellar RNA editing factor</i>
mRNA	messenger-RNA
MS	Murashige und Skoog
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NDH	NADH-Dehydrogenase
NEP	nukleär kodierte plastidäre RNA-Polymerase
NF	Norflurazon

nt	Nukleotide
ORF	offener Leserahmen
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEP	plastidär kodierte plastidäre RNA-Polymerase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPR	Pentatricopeptid <i>repeat</i>
PS I / II	Photosystem I / II
qRT-PCR	quantitative <i>Real Time</i> -PCR
RBP	RNA-Bindeprotein
RIP-Chip	RNA-Immunopräzipitation und Chip-Hybridisierung
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen je Minute
RRM	RNA Erkennungs Motiv (RNA recognition motif)
rRNA	ribosomale RNA
RT	reverse Transkriptase bzw. reverse Transkription
RuBisCo	Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase
s	Sekunde
s.	siehe
S	Svedberg (Sedimentationskoeffizient)
SD	Shine-Dalgarno bzw. Standardabweichung (<i>standard deviation</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat
s.o.	siehe oben
Spec	Spectinomycin
SSC	Natriumchlorid-Natriumcitrat-Puffer (<i>standard saline citrate</i>)
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBST	Tris buffered saline Tween 20
T-DNA Transfer-DNA	
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
tRNA	Transfer-RNA
u	units (Enzymeinheiten)
U	Uracil
UTP	Uridintriphosphat
UTR	nicht translatierte Region (<i>untranslated region</i>)
UV	ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen
ycf	hypothetischer chloroplastidärer Leserahmen
z.B	zum Beispiel

Danksagung

Ich möchte mich bei Prof. Dr. Christian Schmitz-Linneweber für die Möglichkeit an diesem spannenden Thema zu arbeiten, seiner ausgezeichneten Unterstützung und der allgemeinen Zuversicht in meine Arbeit, bedanken. Allzu oft sah er meine experimentellen Fortschritte positiver als ich. Ebenfalls bedanke ich mich vielmals bei Prof. Dr. Kirsten Krause und Prof. Dr. Kerstin Kaufmann für die Begutachtung meiner Arbeit.

Ein großer Dank gilt Hannes (Dr. Ruwe). Ich konnte von Anfang an bei fachlichen Fragen immer auf dich zählen. Durch deine kritischen Hinterfragungen triebst du meine Experimente mit voran und warst zudem ein super netter Arbeitskollege. Ich danke dir auch vielmals für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Ich danke der gesamten Arbeitsgruppe für die schöne Zeit im und außerhalb des Labors. Es sind nun schon 8 Jahre vergangen, seit dem ich von Labor 3 ins Labor 4 wechselte. Während meiner Zeit sah ich viele verschiedene Menschen kommen und gehen. Sie alle zusammen trugen dazu bei, dass der Laboralltag stets interessant und angenehm für mich war.

Unter den Labormitgliedern danke ich vor allem Conny. Du halfst mir nicht nur durch deine technische Unterstützung während meiner Schwangerschaften, sondern warst auch menschlich gesehen eine große Stütze im Labor und sei es nur durch die vielen kleinen Gespräche zwischendurch. Ebenfalls danke ich Julia (Dr. Legen) für die stetige Diskussionsbereitschaft meiner Daten und das Teilen deines großen Erfahrungsschatzes. Sabrina und Christiane, danke für eure zahlreichen Tipps und Tricks und der schönen gemeinsamen Zeit. Yujiao danke ich für die vielen tollen Unterhaltungen und den Einblick in eine andere Kultur. Marie danke, vor allem dass du während meiner letzten Arbeitswochen im Labor warst und nicht wie der Großteil der anderen im Urlaub. Durch deine Anwesenheit wurde es zu einer echt schönen Zeit, die ich in guter Erinnerung behalten werde. Arne, Stephie und Gongwei, euch danke ich für eure Unterstützung und für die schöne, angenehme und lustige Arbeitsatmosphäre.

Auch danke ich all meinen Freunden, die mich in pessimistischen Stunden mit positiver Moral unterstützten. Meinen Eltern danke ich für ihr Vertrauen und ihre Unterstützung während meiner gesamten Zeit in Berlin. Doch ohne Hans wäre es mir nicht möglich gewesen diese Doktorarbeit zu schreiben. Wir beide hatten das Glück in dieser Zeit Eltern von zwei großartigen Söhnen zu werden. Nur durch deine Hilfe und deine Ausdauer, hatte ich überhaupt Zeit mich an meinen Computer zu setzen. Das ist keine Selbstverständlichkeit und ich bin dir dafür sehr dankbar.

Publikationen

Teubner, M., Fuß, J., Kühn, K., Krause, K., und Schmitz-Linneweber, C. (2017). The RNA recognition motif protein CP33A is a global ligand of chloroplast mRNAs and is essential for plastid biogenesis and plant development. *Plant Journal*, **89**, 472-485.

Bohne, A.-V., Teubner, M., Liere, K., Weihe, A. und Börner, T. (2016). *In vitro* promoter recognition by the catalytic subunit of plant phage-type RNA polymerases. *Plant Molecular Biology*, **92**, 357–369.

Ruwe, H., Kupsch, C., Teubner, M. und Schmitz-Linneweber C. (2011). The RNA-recognition motif in chloroplasts. *Journal of Plant Physiology*, **168**, 1361-1371.

Stoppel, R., Manavski, N., Schein, A., Schuster, G., Teubner, M., Schmitz-Linneweber, C. und Meurer, J. (2012). RHON1 is a novel ribonucleic acid-binding protein that supports RNase E function in the Arabidopsis chloroplast. *Nucleic Acids Research*. **40**, 8593–8606.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, die Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfen und Hilfsmittel angefertigt zu haben. Ich habe mich anderwärts nicht um einen Doktorgrad beworben und besitze keinen entsprechenden Doktorgrad. Ich erkläre, dass ich die Dissertation oder Teile davon nicht bereits bei einer anderen wissenschaftlichen Einrichtung eingereicht habe und dass sie dort weder angenommen noch abgelehnt wurde. Ich erkläre die Kenntnisnahme der dem Verfahren zugrunde liegenden Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt-Universität zu Berlin vom 6. Juli 2009.

Berlin, den 12.09.2018

.....
[Marlene Teubner]