

Die Kompaktierung der Nukleoide in
Chloroplasten der Gerste
(*Hordeum vulgare* L.) durch WHIRLY1

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Svenja Oetke
aus Uelzen

Kiel, September 2016

Erste Gutachterin: Prof. Dr. Karin Krupinska

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Frank Kempken

Tag der mündlichen Prüfung: 02.12.2016

zum Druck genehmigt: 02.12.2016

Der Dekan

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Endosymbiontischer Ursprung der Plastiden	1
1.2 Differenzierungsformen der Plastiden	2
1.3 Das Plastidengenom	3
1.4 Organisation der plastidären DNA in Höheren Pflanzen	5
1.5 Nukleoidassoziierte Proteine	7
1.6 Die Familie der WHIRLY-Proteine	10
1.6.1 Entdeckung und strukturelle Charakteristika der WHIRLY-Proteine	11
1.6.2 Subzelluläre Lokalisation der WHIRLY-Proteine.....	13
1.6.3 Funktionen der WHIRLY-Proteine im Zellkern.....	15
1.6.4 Funktionen der WHIRLY-Proteine in den Organellen.....	16
1.7 Zielsetzung	19
2 Material und Methoden	20
2.1 Chemikalien, Enzyme und Oligonukleotide	20
2.2 Pflanzenmaterial	20
2.2.1 Anzucht von Gerste (<i>Hordeum vulgare</i>)	20
2.2.2 WHIRLY1-RNAi-Linien.....	21
2.3 Molekularbiologische Methoden	21
2.3.1 Lösungen und Puffer	21
2.3.2 Medien	22
2.3.3 Arbeitstechniken mit Bakterien.....	22
2.3.3.1 Bakterienstämme	22
2.3.3.2 Anzucht von Bakterienkulturen	22
2.3.3.3 Herstellung chemisch-kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	23
2.3.3.4 Transformation von kompetenten <i>E. coli</i> -Zellen	23
2.3.3.5 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	24

2.3.3.6	Anlegen von Gefrierkulturen	24
2.3.3.7	Heterologe Überexpression von <i>WHIRLY</i> -Genen in <i>E. coli</i>	25
2.3.3.8	Färbung bakterieller Nukleide mit DAPI	25
2.3.3.9	Komplementationsversuche mit <i>E. coli</i> -Mutanten	26
2.3.4	Amplifizierung von DNA-Fragmenten mittels Polymerase-Kettenreaktion	27
2.3.5	Quantifizierung von Nukleinsäuren	29
2.3.6	Auftrennung von Nukleinsäuren mittels Agarose-Gelelektrophorese	29
2.3.7	Klonierung von DNA-Fragmenten	30
2.3.7.1	Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen	30
2.3.7.2	Ligation	30
2.3.7.3	Klonierung von Expressionsvektoren zur Überexpression von rekombinanten <i>WHIRLY</i> -Proteinen in <i>E. coli</i>	30
2.3.8	Ortsspezifische Mutagenese	31
2.3.9	Sequenzierung von Plasmid-DNA	34
2.3.10	Isolierung genomischer DNA aus Gerste	34
2.3.11	Relative Quantifizierung der plastidären DNA	35
2.3.11.1	DNA Dot-Blot	35
2.3.11.2	Quantitative PCR (qPCR)	36
2.3.12	Isolierung von Gesamt-RNA aus Gerste	37
2.3.13	Synthese von cDNA	38
2.3.14	Quantitative <i>Real-Time</i> PCR (pRT-PCR)	38
2.3.15	Färbung von Nukleoiden mittels YO-PRO®-1	39
2.3.16	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM)	39
2.4	Methoden zur Analyse von Proteinen	40
2.4.1	Herstellung von Bakterienlysaten	40
2.4.2	Zellaufschluss unter nativen Bedingungen	40
2.4.3	Native Proteinaufreinigung mittels Affinitätschromatographie an Nickel-NTA	40
2.4.4	Isolierung von Gesamtprotein aus Pflanzenmaterial	41
2.4.5	Isolierung von plastidären Nukleoiden aus Gerste	42
2.4.6	Proteinfällung	44
2.4.7	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	44
2.4.8	Auftrennung von Proteinen mittels denaturierender SDS-Polyacrylamid- Gelelektrophorese	44

2.4.9	Färbung von Proteinen in SDS-Polyacrylamid-Gelen	46
2.4.10	Western Blot Transfer	46
2.4.11	Färbung von Proteinen auf Nitrozellulose-Membranen	47
2.4.12	Immundetektion von Proteinen.....	47
2.4.13	Densitometrische Auswertung.....	49
2.5	Datenbanken und Internetseiten	49
3	Ergebnisse.....	50
3.1	Einfluss von WHIRLY1 auf die plastidären Nukleotide in Gerste.....	50
3.1.1	Untersuchungen zur entwicklungsabhängigen Regulation von WHIRLY1	50
3.1.2	Untersuchungen zum Einfluss des WHIRLY1-Proteins auf die Struktur plastidärer Nukleotide	51
3.2	Untersuchungen zum Einfluss von WHIRLY-Proteinen auf die Struktur von Nukleoiden in <i>E. coli</i>.....	60
3.2.1	Einfluss des WHIRLY1-Proteins der Gerste auf die Kompaktierung bakterieller Nukleotide von <i>E. coli</i>	60
3.2.2	Bedeutung des Nukleinsäure-Bindemotivs von HvWHIRLY1 für die Kompaktierung bakterieller Nukleotide.....	64
3.2.3	Bedeutung von konservierten Sequenzmotiven der WHIRLY-Proteine für die Kompaktierung bakterieller Nukleotide durch HvWHIRLY1	65
3.2.4	Einfluss der plastidären WHIRLY-Proteine von Arabidopsis und Mais auf die Kompaktierung bakterieller Nukleotide	68
3.2.5	Bedeutung des N-Terminus von HvWHIRLY1 für die Kompaktierung von Nukleoiden	71
3.2.6	Analyse des N-Terminus von HvWHIRLY1 zur Identifizierung des für die Kompaktierung wichtigen Bereichs	74
3.2.7	Untersuchungen zum Einfluss der WHIRLY2-Proteine auf die Nukleoidverpackung in <i>E. coli</i>	82
3.2.8	Einfluss eines chimären Proteins aus dem WHIRLY1-Protein von Arabidopsis und dem PRAPP-Motiv auf die Nukleotide von <i>E. coli</i>	86
3.3	Lichtabhängige Regulation des WHIRLY1-Proteins der Gerste und der Nukleoidkompaktierung.....	89
3.3.1	Abhängigkeit der WHIRLY1-Proteinmenge von der Lichtintensität.....	89
3.3.2	Auswirkungen von unterschiedlichen Lichtintensitäten auf den plastidären DNA-Gehalt und die Struktur der Nukleotide	95

3.3.3	Das HvWHIRLY1-Protein in plastidären Nukleoidfraktionen	101
4	Diskussion	106
4.1	Die Kompaktierungsaktivität von WHIRLY-Proteinen.....	106
4.1.1	Das PRAPP-Motiv bewirkt die Kompaktierungsaktivität des HvWHIRLY1- und des ZmWHIRLY1-Proteins.....	106
4.1.2	Vorkommen des PRAPP-Motivs innerhalb der WHIRLY-Proteinfamilie.....	108
4.1.3	Das PRAPP-Motiv in monokotylen WHIRLY1-Proteinen.....	108
4.1.4	Histon H1-ähnliche Proteine enthalten ein PRAPP-Motiv	110
4.1.5	WHIRLY2-Proteine können bakterielle Nukleotide nicht kompaktieren.....	111
4.1.6	Bedeutung der Dimerisierung von HvWHIRLY1 für die Kompaktierung der Nukleotide	112
4.2	Entwicklungsabhängige Kompaktierung der Nukleotide durch HvWHIRLY1	115
4.3	Auswirkungen unterschiedlicher Lichtintensitäten auf die Menge an HvWHIRLY1 und die plastidären Nukleotide	119
4.3.1	HvWHIRLY1 wird zur Anpassung an hohe Lichtintensitäten benötigt.....	119
4.3.2	Lichtabhängige Veränderungen in der Proteinzusammensetzung von Nukleoidfraktionen	123
4.4	Funktionelle Unterschiede zwischen den plastidären WHIRLY-Proteinen verschiedener Arten	125
4.5	Schlussfolgerung	127
4.6	Ausblick	129
5	Zusammenfassung	131
5	Summary.....	132
6	Literaturverzeichnis.....	133
7	Anhang.....	147
8	Danksagung	157
9	Lebenslauf	158
10	Erklärung	159

Abkürzungsverzeichnis

A	Anhydrotetracyclin	OD	optische Dichte
ad	auffüllen auf	PA	Polyacrylamid
APS	Ammoniumpersulfat	<i>p.a.</i>	für Analysen geeignet (<i>pro analysis</i>)
BSA	Rinderserumalbumin	PAD	vorhergesagte Auto- regulationsdomäne
CBM	Kupferbindemotiv	PAGE	Polyacrylamid- Gelelektrophorese
cDNA	komplementäre DNA (<i>copy DNA</i>)	PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol	PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
DBM	Nukleinsäure-Bindemotiv	PEG	Polyethylenglycol
DIG	Digoxigenin	<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat	PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
DTT	Dithiothreitol	PR	<i>pathogenesis related</i>
ECL	verstärkte Chemilumineszenz (<i>enhanced chemiluminescence</i>)	ptDNA	plastidäre DNA
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	ptNAP	plastidäres nukleoid- assoziiertes Proteine
<i>g</i>	Erdbeschleunigung	qPCR	quantitative PCR
gDNA	genomische DNA	qRT-PCR	quantitative <i>Real-Time</i> PCR
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1- piperazin-ethansulfonsäure	RNAi	RNA-Interferenz
HL	Hochlicht	ROS	reaktive Sauerstoffspezies (<i>reactive oxygen species</i>)
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>	rRNA	ribosomale RNA
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactosid	RT-PCR	reverse Transkriptase PCR
(k)bp	(Kilo-) Basenpaare	SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfat</i>)
kDa	Kilodalton	SL	Schwachlicht
LB	Nährmedium nach Luria Bertani	SSC	<i>saline-sodium citrate</i>
LHC	Lichtsammelkomplex (<i>light harvesting complex</i>)	TAC	Transkriptionsaktives Chromosom (transcriptionally active chromosome)
mRNA	<i>messenger</i> RNA		
mtDNA	mitochondriale DNA		
NAP	nukleoidassoziiertes Protein		

TAE	Tris-Acetat-EDTA	Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TBS(T)	<i>Tris-buffered saline</i> (Tween-20)	U	Einheit (<i>Units</i>)
TCA	Trichloressigsäure	UpM	Umdrehungen pro Minute
TE	Tris-EDTA	v/v	Volumenprozent
TEMED	Tetramethylethylendiamin	w/v	Gewichtsprozent
TIC/TOC	<i>translocon at the inner/outer envelope membrane of chloroplasts</i>		

Proteine:

Dps	<i>DNA protection from starvation</i>
Fis	<i>factor for inversion stimulation</i>
GFP	grün fluoreszierendes Protein (<i>green fluorescent protein</i>)
GUN1	<i>genomes uncoupled 1</i>
H-NS	<i>histone-like nucleoid structuring</i>
HU	<i>heat-unstable</i>
IHF	<i>integration host factor</i>
LHCB1	<i>light-harvesting chlorophyll-protein complex II subunit B1</i>
MFP1	<i>matrix attachment region-binding filament-like protein 1</i>
NPR1	<i>nonexpressor of pathogenesis-related genes 1</i>
PEND	<i>plastid envelope DNA-binding</i>
PEP	plastidär kodierte RNA Polymerase (<i>plastid encoded RNA polymerase</i>)
PhANGs	<i>photosynthesis-associated nuclear genes</i>
PRIN2	<i>plastid redox insensitive 2</i>
PsbA	D1 Protein des Photosystems II
pTAC12	<i>plastid transcriptionally active chromosome protein 12</i>
Rubisco	Ribulose-1,5-bisphosphat Carboxylase/Oxygenase
SIR	Sulfit-Reduktase
SVR4/-like	<i>suppressor of variegation 4(-like)</i>
SWIB-4	<i>SWIB domain-containing protein-4</i>
TCP34	<i>tetratricopeptide-containing chloroplast protein of 34 kDa</i>

1 Einleitung

1.1 Endosymbiontischer Ursprung der Plastiden

Plastiden gelten als die typischen Organellen der pflanzlichen Zelle. In ihnen erfolgt einer der bedeutendsten Stoffwechselprozesse auf der Erde: Die Photosynthese, bei der es mit Hilfe von Sonnenenergie zur Fixierung von Kohlenstoff und so zur Assimilierung von organischen Substanzen und zur Freisetzung von Sauerstoff kommt. Darüber hinaus laufen in den Plastiden auch eine Vielzahl anderer wichtiger Stoffwechselprozesse ab. So findet hier die Biosynthese von Chlorophyllen und Carotinoiden sowie die von Aminosäuren und Fettsäuren statt.

Bei Plastiden handelt es sich um Organellen, die wie die Mitochondrien über eigene DNA verfügen. Neben dem Kerngenom sind in pflanzlichen Zellen somit zwei weitere Genome enthalten: das Plastom, das Genom der Plastiden, und das Chondriom, das Genom der Mitochondrien. Plastiden und Mitochondrien stammen nach der Endosymbiontentheorie von prokaryotischen Organismen ab. Demzufolge sind Plastiden aus Vorfahren der heute lebenden Cyanobakterien und die Mitochondrien aus α -Proteobakterien hervorgegangen, die durch Endozytose von einer eukaryotischen Urzelle aufgenommen wurden und sich im Laufe der Evolution zu semiautonomen Organellen entwickelten (Schimper 1883; Gray 1989). Die prokaryotische Abstammung wird anhand des eigenen Genoms, eigener 70 S Ribosomen sowie der Vermehrung durch Teilung deutlich. Darüber hinaus enthält die äußere der beiden plastidären Hüllmembranen Membranproteine, die von Porinen der gram-negativen Vorfahren abstammen (Bredemeier et al. 2007; Duy et al. 2007). Während der Evolution kam es zu einem Gentransfer plastidärer Gene in den Zellkern, so dass der Großteil der Plastidenproteine heute im Zellkern und nicht mehr im Organell selbst kodiert wird, wodurch die Plastiden nach und nach unter die Kontrolle des Zellkerns und der Wirtszelle gelangten (Race et al. 1999; Martin et al. 2002). Der Transfer des genetischen Materials aus den Plastiden in den Zellkern erforderte die Entstehung eines Mechanismus zum Transport von organellären Proteinen aus dem Cytoplasma in die Plastiden. Dies ist mit Hilfe des TIC/TOC-Importapparates (*translocon at the outer/inner envelope membrane of chloroplasts*) realisiert worden, der plastidäre Proteine selektiv über die Hüllmembran in die Plastiden importieren kann (Jarvis & López-Juez 2013).

1.2 Differenzierungsformen der Plastiden

In Höheren Pflanzen sind je nach Gewebe verschiedene Differenzierungsformen der Plastiden zu finden. Als Vorläufer aller Plastiden gelten die Proplastiden, die in meristematischen Geweben anzutreffen sind (Robertson & Laetsch 1974). Etwa 10–20 Proplastiden, bei denen es sich um 1–3 μm große, undifferenzierte Plastiden handelt, sind in jeder meristematischen Zelle enthalten (Pyke 1999). Wie alle Plastidenformen vermehren sich die Proplastiden ausschließlich durch Teilung. Bevor sich die meristematische Zelle selbst teilt, erfolgt eine Teilung der Proplastiden, so dass eine gleichmäßige Anzahl von Proplastiden auf die entstehenden Tochterzellen verteilt werden kann (Chaly & Possingham 1981).

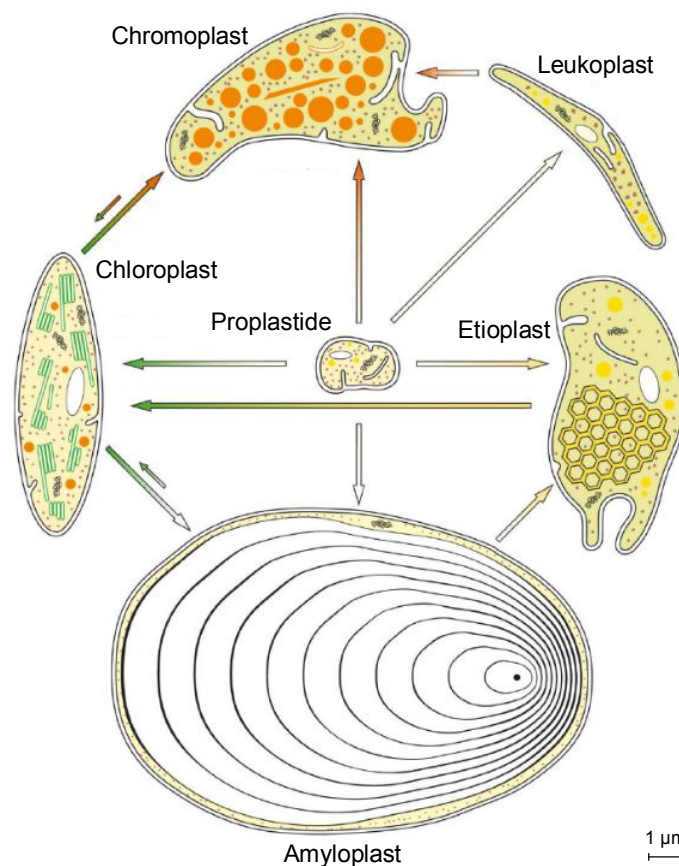


Abb. 1: Übersicht über die wichtigsten Differenzierungsformen und Differenzierungswege der Plastiden in Höheren Pflanzen.

Die Differenzierungswege und die wechselseitigen Entwicklungsmöglichkeiten sind durch die Pfeile dargestellt. Übernommen aus Wanner 2004.

In welche Plastidenform sich die Proplastiden differenzieren, ist abhängig von organ-, zell- und entwicklungsspezifischen Prozessen (Taylor 1989). In Mesophyllzellen differenzieren

sich die Proplastiden im Licht zu den photosynthetisch aktiven Chloroplasten, welche einen Durchmesser von 6–8 µm aufweisen (Klein & Mullet 1986) (Abb. 1). Die Anzahl der Chloroplasten in einer ausdifferenzierten Mesophyllzelle ist abhängig von der Art. Während eine Mesophyllzelle der Gerste (*Hordeum vulgare*, *H. vulgare*) etwa 60 Chloroplasten enthält, sind in der Acker-Schmalwand (*Arabidopsis thaliana*, *A. thaliana*) 120 Chloroplasten zu finden (Baumgartner et al. 1989; Pyke & Leech 1994).

Da die Synthese von Chlorophyll in Angiospermen, genauer die Reduktion von Protochlorophyllid zu Chlorophyllid, lichtabhängig ist (Adamson et al. 1997), entwickeln sich in Abwesenheit von Licht in Angiospermen Etioplasten, welche photosynthetisch inaktiv sind und eine semikristalline Struktur, den Prolamellarkörper, besitzen (Robertson & Laetsch 1974; Kuroiwa et al. 1981; Baumgartner et al. 1989). Der Prolamellarkörper enthält Material zum Aufbau der Thylakoide während der lichtabhängigen Differenzierung der Chloroplasten (Abb. 1). Während der letzten Lebensphase eines Blattes, der Seneszenz, kommt es zu einer Umdifferenzierung der Chloroplasten in Gerontoplasten (Sitte 1977). Neben den genannten Plastidenformen gibt es außerdem Leukoplasten und Chromoplasten, die Speicherformen darstellen und wie die Etioplasten keine Photosynthese betreiben können. Leukoplasten sind unpigmentierte Plastiden und werden in Amylo-, Elaio- und Proteinoplasten untergliedert, welche der Speicherung von Stärke, Ölen bzw. Proteinen dienen. Die Chromoplasten enthalten große Mengen von Carotinoiden und sind in Blüten und Früchten zu finden, wo sie deren Farbe bestimmen (Juneau et al. 2002).

Die Plastidendifferenzierung ist kein endgültiger, sondern ein dynamischer Prozess (Abb. 1). Es kann zu Redifferenzierungen kommen, bei denen sich die differenzierten Plastidenformen in andere umwandeln können. So gehen beispielsweise Chloroplasten während der Fruchtreife in Chromoplasten über (Bouvier et al. 1998).

1.3 Das Plastidengenom

Die plastidäre DNA (ptDNA) wurde lange Zeit als zirkuläres Molekül, das bei photosynthetisch aktiven Pflanzen eine Größe von 115–165 kbp aufweist, angesehen (Kolodner & Tewari 1975; Sato et al. 2003; Saski et al. 2007). In der Gerste besitzt die ptDNA eine Größe von 136 kbp und wurde 2007 vollständig sequenziert (Saski et al. 2007). Neuere Untersuchungen deuten allerdings darauf hin, dass die ptDNA zum Großteil als lineare Moleküle und nur zu wenigen Prozent in der zirkulären Form vorliegt (Oldenburg & Bendich 2004).

Durch den während der Evolution stattgefundenen Gentransfer aus den Plastiden in den Zellkern, bei dem es sich um einen kontinuierlich ablaufenden Prozess handelt, der auch

heute noch erfolgt und mit Hilfe von Markergenen nachgewiesen werden kann (Huang et al. 2003; Stegemann et al. 2003), ist nur noch ein kleiner Teil der plastidären Proteine im Plastidengenom kodiert. Das Plastidengenom rezenter Pflanzen und Algen enthält heute in der Regel noch zwischen 50 und 200 Gene (Race et al. 1999). Demgegenüber weisen die Plastiden etwa 2000–3000 Proteine auf, von denen die meisten aus dem Cytoplasma in die Plastiden importiert werden müssen (Martin & Herrmann 1998; Sakai et al. 2004; Jarvis & López-Juez 2013). Das Plastidengenom kodiert u. a. Proteine für die plastidäre Transkriptions- und Translationsmaschinerie wie z. B. ribosomale RNAs (rRNAs), Transfer-RNAs (tRNAs) und Untereinheiten der plastidär kodierten RNA Polymerase (*plastid encoded RNA polymerase*; PEP) (Kim et al. 1993; Martin & Herrmann 1998; Sasaki et al. 2007). Daneben finden sich Gene, die für Untereinheiten der NADH-Dehydrogenase, die große Untereinheit von Ribulose-1,5-bisphosphat Carboxylase/Oxygenase (Rubisco), die ATP-Synthase sowie für Proteine des Photosyntheseapparates kodieren (Abb. 2).

Die Replikation der ptDNA erfolgt mit Hilfe von organellären DNA Polymerasen, welche zur Familie A der DNA Polymerasen gehören und auf Grund ihrer Sequenzähnlichkeit zur DNA Polymerase I von *Escherichia coli* (*E. coli*) als PolII oder PolII-like bezeichnet werden (Moriyama et al. 2011). Sie katalysieren sowohl die Replikation in den Plastiden als auch in den Mitochondrien, weshalb sie als organelläre DNA Polymerasen bezeichnet werden. Während in den Plastiden von *Arabidopsis* und *Nicotiana tabacum* (*N. tabacum*) zwei organelläre DNA Polymerasen PolIIA und PolIIB (Christensen et al. 2005; Ono et al. 2007; Parent et al. 2011) an der Replikation der plastidären DNA beteiligt sind, konnte in monokotylen Pflanzen wie Reis (*Oryza sativa*, *O. sativa*), Mais (*Zea mays*, *Z. mays*) und Gerste nur jeweils eine PolII-like DNA Polymerase identifiziert werden (Kimura et al. 2002; Udy et al. 2012; Krupinska et al. 2014a). Die organellären DNA Polymerasen sind im Zellkern kodiert und müssen nach der Translation über eine N-terminale Importsequenz in die Plastiden bzw. Mitochondrien importiert werden. Für den Ablauf der Replikation der ptDNA sind insgesamt drei verschiedene Mechanismen beschrieben, der *double D-loop* Mechanismus, die *rolling circle* und die rekombinationsabhängige Replikation (Nielsen et al. 2010). Es wird vermutet, dass die Vervielfältigung der ptDNA in Abhängigkeit vom Replikationsmechanismus mit unterschiedlicher Geschwindigkeit zu unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten erfolgt (Nielsen et al. 2010).

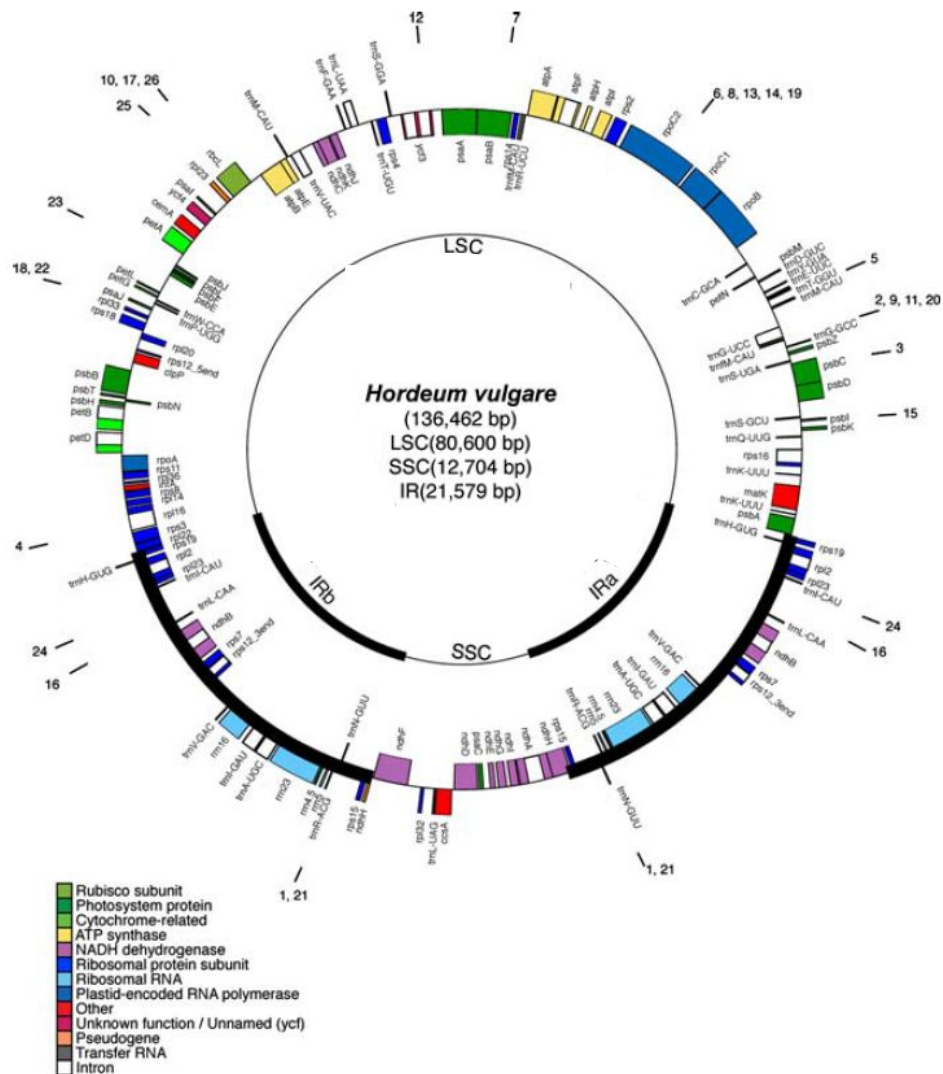


Abb. 2: Plastidengenom von *Hordeum vulgare*.

LSC = *large single copy*, SSC = *short single copy*, IRa und IRb = *inverted repeats a und b*. (verändert nach Saski et al., 2007)

1.4 Organisation der plastidären DNA in Höheren Pflanzen

Die ptDNA ist in den Plastiden in Form von Nukleoiden organisiert. Der Begriff leitet sich von der Organisation der bakteriellen DNA ab. Diese liegt in Bakterien als distinkte Struktur, die Nukleoid genannt wird, im Cytoplasma aggregiert vor, ohne von einer Membran umgeben zu sein (Sakai et al. 2004). Plastidäre Nukleotide stellen DNA-Protein-Strukturen dar, die neben der ptDNA und zahlreichen (DNA-bindenden) Proteinen auch RNA-Moleküle enthalten (Sato et al. 2003; Sakai et al. 2004; Terasawa & Sato 2005). Jedes Nukleoid enthält mehr als zehn Kopien der ptDNA (Kuroiwa 1991). In den Nukleoiden erfolgen sowohl die Replikation und die Transkription plastidärer Gene als auch posttranskriptionale Prozesse (Melonek et al. 2016). Die Anzahl und Verteilung der Nukleotide ändert sich entwicklungsabhängig und weist

auch taxonomische Unterschiede auf (Kuroiwa et al. 1981; Kuroiwa 1991). So unterscheidet sich die Morphologie der Nukleioide von Braunalgen, Grünalgen und Höheren Pflanzen zum Teil erheblich. Im Folgenden wird nur genauer auf die Morphologie der Nukleioide in Höheren Pflanzen eingegangen.

In Proplastiden meristematischer Zellen ist zu Beginn der Keimung nur ein einzelnes Nukleoid im Zentrum lokalisiert, welches während der Keimung an die innere Hüllmembran wandert und dort eine ringförmige Struktur ausbildet (Miyamura et al. 1986). In sich entwickelnden Chloroplasten nimmt die Anzahl der Nukleioide dann deutlich zu und die Ringstruktur zerfällt in einzelne Nukleioide, die in Form einer Perlenkette an die innere Hüllmembran gebunden sind (Kuroiwa et al. 1981; Miyamura et al. 1986; Sato et al. 1993; 2003). In ausdifferenzierten Chloroplasten sind je nach Spezies 20–40 Nukleioide über den gesamten Chloroplasten verteilt (Kuroiwa et al. 1981; Yurina et al. 1995), wobei es während der Chloroplastenentwicklung zu einer Assoziation der Nukleioide mit der Thylakoidmembran kommt (Liu & Rose 1992). An der Bindung der Nukleioide an die innere Hüllmembran bzw. die Thylakoidmembran sind verschiedene Proteine beteiligt. In der frühen plastidären Entwicklung verankert das PEND-Protein (*plastid envelope DNA-binding*) die Nukleioide an der inneren Hüllmembran (Sato et al. 1993). PEND ist ein Dimer, das sich aus zwei 70 kDa großen Protein-Untereinheiten zusammensetzt, wobei jedes Monomer eine N-terminale DNA-bindende Domäne und eine C-terminale Transmembrandomäne besitzt (Sato & Ohta 2001; Sato et al. 2003; Terasawa & Sato 2005). Da PEND nur in sich entwickelnden Chloroplasten vorkommt, wurde vermutet, dass PEND außerdem die Replikation der ptDNA beeinflusst, die in diesem frühen Entwicklungsstadium abläuft (Sato et al. 1998; 2003). Für das Protein MFP1 (*matrix attachment region-binding filament-like protein 1*) wird angenommen, dass es die Nukleioide in ausdifferenzierten Chloroplasten mit der Thylakoidmembran assoziiert (Jeong et al. 2003). MFP1 besitzt eine C-terminale DNA-bindende Domäne und eine N-terminale Transmembrandomäne, über welche es an die Nukleioide bzw. an die Thylakoidmembran bindet. Es wurde diskutiert, dass die Assoziation der Nukleioide an die innere Hüllmembran eine aktive Replikation der ptDNA ermöglicht, wohingegen eine spezifische Expression der plastidären Gene erst durch Bindung der Nukleioide an die Thylakoidmembran erlaubt wird (Sato et al. 2003; Sakai et al. 2004). Nicht nur die Anzahl und Verteilung der Nukleioide ändert sich entwicklungsabhängig, auch die Proteinzusammensetzung der Nukleioide unterliegt Veränderungen, wie Proteomanalysen zeigen konnten (Majeran et al. 2012; Melonek et al. 2016). Diese Veränderungen gehen möglicherweise mit einem Funktionswechsel der Plastiden von der Replikation zur Transkription einher (Sato et al. 1997).

Die biochemische Präparation der ptDNA kann auf zwei unterschiedliche Weisen erfolgen. Das Transkriptionsaktive Chromosom (TAC), das zur Untersuchung der

Transkriptionsaktivität dient (Krause & Krupinska 2000), kann über Gelfiltration aus plastidären Membranfraktionen aufgereinigt werden (Pfalz et al. 2006; Melonek et al. 2010; 2012), während die Isolierung der Nukleoide, welche mikroskopisch mit DNA-Fluoreszenzfarbstoffen visualisier- und nachweisbar sind (Kuroiwa et al. 1981; Yurina et al. 1995; Sato et al. 2003), mittels differentieller Zentrifugation erfolgt (Cannon et al. 1999; Majeran et al. 2012). Trotz der unterschiedlichen Präparation ist die Überlappung der Proteinzusammensetzung von TAC- und Nukleoidfraktionen sehr groß, wie kürzlich durch einen Vergleich verschiedener Proteomdaten gezeigt werden konnte (Melonek et al. 2016).

1.5 Nukleoidassoziierte Proteine

Die Kompaktierung der pro- und eukaryotischen DNA ist unerlässlich, um die gesamte genetische Information in einer Zelle bzw. in einem Zellkern unterbringen zu können (Luijsterburg et al. 2008). Am besten untersucht ist die Organisation der genomischen DNA im Zellkern von Eukaryoten, welche in Form des Chromatins mit Hilfe von Histonen strukturiert ist (Campos & Reinberg 2009). Posttranslationale Veränderungen von Histonen wie Acetylierung und Methylierung sowie DNA-Methylierungen können die Chromatin-Struktur verändern und damit u. a. die Transkription bestimmter Gene oder die Replikation der DNA positiv bzw. negativ beeinflussen (Li & Reinberg 2011).

Analog dazu besitzen Bakterien sogenannte Histon-ähnliche Proteine (*histone-like proteins*, HLP), welche die Verpackung und Organisation der bakteriellen DNA ermöglichen, sich jedoch von den Histonen der Eukaryoten strukturell unterscheiden (Luijsterburg et al. 2008; Dillon & Dorman 2010; Macvanin & Adhya 2012). Auf Grund der strukturellen Unterschiede wurde die Bezeichnung Histon-ähnliche Proteine durch nukleoidassoziierte Proteine (NAP) ersetzt (Dillon & Dorman 2010). NAPs können die bakterielle DNA auf verschiedene Weise kompaktieren und werden entsprechend ihrer Fähigkeit unterschiedlichen Gruppen zugeordnet: den *benders*, *wrappers* oder *bridgers* (Luijsterburg et al. 2008). So wird die DNA z. B. spiralisiert, geknickt oder es werden Schleifen gebildet. Beispiele für bakterielle NAPs sind HU (*heat-unstable*), H-NS (*histone-like nucleoid structuring*), IHF (*integration host factor*), Fis (*factor for inversion stimulation*) und Dps (*DNA protection from starvation*), deren Molekulargewicht kleiner als 20 kDa ist (Sakai et al. 2004; Dame 2005; Luijsterburg et al. 2006; 2008; Dillon & Dorman 2010). Durch Kompaktierung der bakteriellen Nukleoide können NAPs die Zugänglichkeit der DNA für Proteine, wie z. B. RNA bzw. DNA Polymerasen sowie Transkriptionsfaktoren, verändern und dadurch Prozesse wie die Replikation und Transkription beeinflussen. Die Proteinzusammensetzung der bakteriellen Nukleoide ändert sich in Abhängigkeit von der Wachstumsphase. So akkumuliert Fis

vermehrt in der frühen exponentiellen Phase und scheint eine Rolle bei der Genexpression zu spielen, während Dps in der stationären Phase verstärkt exprimiert wird und die DNA in dieser Phase vor Schäden schützt (Dillon & Dorman 2010).

Trotz des endosymbiontischen Ursprungs der Plastiden wurden bis heute keine zu den bakteriellen NAPs ähnlichen Proteine in den Plastiden von Landpflanzen nachgewiesen (Sato et al. 2003; Sakai et al. 2004; Yagi & Shiina 2014). Im Unterschied dazu konnten bakterielle NAPs in Dinoflagellaten und Apicomplexa sowie in einigen Algenarten identifiziert werden (Sato et al. 2003; Chan et al. 2006). So ist in der Rotalge *Cyanidioschyzon merolae* (*C. merolae*) ein Homolog des HU-Proteins zu finden, welches zudem von der ptDNA kodiert wird (Kobayashi et al. 2002). Auch in der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* (*C. reinhardtii*) konnte ein allerdings kernkodiertes NAP, das an der Verpackung der plastidären DNA beteiligt ist, nachgewiesen werden (Karcher et al. 2009). Außerdem konnten NAPs im Apicoplasten von *Plasmodium falciparum* (Ram et al. 2008) und im Zellkern von Dinoflagellaten identifiziert werden, wo sie die Aufgabe von Histonen übernehmen (Chan et al. 2006). Auf Grund des Fehlens bakterieller NAPs in den Höheren Pflanzen wurde die Hypothese aufgestellt, dass sie verloren gegangen seien (Sato et al. 2003; Sakai et al. 2004). Demnach müssen folglich eukaryotische Proteine die Kompaktierung der ptDNA in den Plastiden der Höheren Pflanzen übernommen haben (Sakai et al. 2004; Kodama 2007). Diese eukaryotischen, an DNA bindenden Proteine werden plastidäre nukleoidassoziierte Proteine (ptNAP) genannt und sind kernkodiert (Krupinska et al. 2013).

Mit Hilfe von Proteomanalysen konnten bisher zahlreiche ptNAPs nachgewiesen werden, u. a. Proteine, die an der Transkription sowie Translation, der Replikation und Rekombination beteiligt sind (Pfalz et al. 2006; Majeran et al. 2012; Melonek et al. 2012; 2016). Zudem konnten auch Proteine, die an der strukturellen Organisation der ptDNA involviert sind, identifiziert werden (Tab. 1) (Krupinska et al. 2013; Powikrowska et al. 2014a; Melonek et al. 2016). Unter diesen Architekturproteinen befinden sich jedoch nur zwei Proteine, die Sulfid-Reduktase (SIR) und SWIB-4 (*SWIB domain-containing protein-4*), mit möglicher Kompaktierungsaktivität. Bei SIR handelt es sich um ein Protein mit dualer Funktion. So ist SIR zum einen als Enzym im Stroma an der Assimilation von Schwefel involviert (Sato et al. 2001; Sekine et al. 2002; 2007) und zum anderen in einigen Arten, *Glycine max* (*G. max*) (Cannon et al. 1999), *Pisum sativum* (*P. sativum*) (Sekine et al. 2007) und *Nicotiana benthamiana* (*N. benthamiana*) (Kang et al. 2010), an der Kompaktierung der Nukleoide beteiligt. SIR ist ein sehr abundantes Protein der plastidären Nukleoide, welches ohne Sequenzspezifität an einzel- sowie doppelsträngige DNA bindet und eine verstärkte Kompaktierung der Nukleoide bewirkt, wodurch die Replikation und Transkription inhibiert

werden (Cannon et al. 1999; Sekine et al. 2002; 2007). Die Bindung an DNA hat jedoch keinen Einfluss auf die Enzymaktivität (Sato et al. 2001; Sekine et al. 2002; 2007).

Für das zweite mögliche Kompaktierungsprotein SWIB-4 von *Arabidopsis* liegen bislang nur Hinweise für eine Kompaktierungsaktivität *in planta* vor. Ein SWIB-Protein wurde im TAC von Spinatchloroplasten identifiziert und Kollokalisationsstudien mit PEND ermöglichten den Nachweis, dass SWIB-4 mit den Nukleoiden assoziiert ist. Durch heterologe Expressionsstudien in *E. coli* konnte gezeigt werden, dass SWIB-4 bakterielle Nukleotide kompaktieren und die Funktion des H-NS Proteins in einer *hns-E. coli*-Mutante übernehmen kann (Melonek et al. 2012). Darüber hinaus verfügt SWIB-4 über eine Histon H1-ähnliche Domäne, für die eine Rolle bei der Kompaktierung der Nukleotide angenommen wird. Der Nachweis für eine Funktion als Kompaktierungsprotein in *Arabidopsis* fehlt jedoch noch.

Tab. 1: Architekturproteine der plastidären DNA in Höheren Pflanzen.

IEP = isoelektrischer Punkt, * = der isoelektrische Punkt wurde mit dem *Compute pI/Mw tool* von ExPASy ermittelt. # = die kompaktierende Wirkung wurde bisher nur für das SWIB-4 Protein von *Arabidopsis thaliana* in *E. coli* gezeigt.

Name des Proteins	Funktion	Organismus	Molekulargewicht	IEP	Referenz
MFP1	Assoziation der Nukleotide an die Thylakoidmembran	<i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>Nicotiana tabacum</i>	90 kDa	8,5	Jeong et al. 2003
PEND	Assoziation der Nukleotide an die innere Hüllmembran	<i>Pisum sativum</i> , <i>Brassica napus</i>	130 kDa	4,6*	Sato et al. 1993, 1998, Sato und Ohta 2001, Terasawa und Sato 2005, Wycliffe et al. 2005
SIR	Kompaktierung der DNA	<i>Glycine max</i> , <i>Pisum sativum</i> , <i>Nicotiana benthamiana</i>	68 kDa	9,1*	Cannon et al. 1999, Sekine et al. 2002, 2007, Sato et al. 2001, Kang et al. 2010
SWIB-4	Kompaktierung der DNA	<i>Arabidopsis thaliana</i> #	12 kDa	10	Melonek et al. 2012
SVR4/ SVR4-like	Chaperon für ptNAPs	<i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>Hordeum vulgare</i>	28 kDa	5,2*	Powikrowska et al. 2014b
TCP34	Verankerung der Nukleotide an die Thylakoidmembran	<i>Spinacia oleracea</i>	38 kDa	5,4*	Weber et al. 2006
YlmG	Verteilung der Nukleotide	<i>Arabidopsis thaliana</i>	23 kDa	10,6*	Kabeya et al. 2010

SVR4/MRL7 und SVR4-like/MRL7-like (*suppressor of variegation 4(-like)*) sind zwei weitere ptNAPs, die mit Hilfe von Proteomanalysen in den Nukleoiden des Mais und mittels Kollokalisationsstudien in Assoziation mit Nukleoiden in *Arabidopsis* nachgewiesen werden konnten (Qiao et al. 2011; Majeran et al. 2012). In *svr4-* bzw. *svr4-like*-*Arabidopsis*mutanten wurde eine veränderte Nukleoidstruktur beobachtet, wonach die Nukleoide in den Mutanten im Unterschied zum Wildtyp in größeren Aggregaten bzw. in einer ringförmigen Struktur vorlagen (Powikrowska et al. 2014b). Die veränderte Nukleoidstruktur ging in beiden Mutanten mit einer verringerten Menge PEP-abhängiger Transkripte einher (Qiao et al. 2011; Powikrowska et al. 2014b). Allerdings weisen weder SVR4 noch SVR4-like eine Nukleinsäure-Bindedomäne auf, so dass eine direkte Interaktion der Proteine mit der DNA als unwahrscheinlich gilt. Auf Grund einer großen Anzahl von negativ-geladenen Aminosäuren in der Proteinsequenz von SVR4 und SVR4-like wird für die beiden Proteine vielmehr eine Funktion als Chaperon für die Interaktion der ptNAPs mit der ptDNA angenommen, wonach sie die korrekte Assemblierung der Nukleoide sicherstellen und eine zufällige Aggregatbildung der DNA-Protein-Strukturen verhindern könnten (Powikrowska et al. 2014b).

Das Protein TCP34 (*tetratricopeptide-containing chloroplast protein of 34 kDa*) wurde sowohl im TAC als auch in den Nukleoiden nachgewiesen (Weber et al. 2006; Melonek et al. 2010; Majeran et al. 2012). Zudem konnte die Bindung von TCP34 an ptDNA bestätigt werden, die möglicherweise durch ein Helix-Loop-Helix-Motiv vermittelt wird (Weber et al. 2006). Darüber hinaus verfügt TCP34 über eine C-terminale Transmembrandomäne, über die eine Assoziation an die Thylakoidmembran erfolgt. Wie MFP1 interagiert TCP34 sowohl mit der Thylakoidmembran als auch mit den Nukleoiden, so dass für TCP34 eine Funktion bei der Verankerung der Nukleoide an die Thylakoidmembran diskutiert wird (Weber et al. 2006; Majeran et al. 2012).

Bei einem weiteren Protein, das ebenfalls in Nukleoidfraktionen identifiziert werden konnte, handelt es sich um YlmG (Majeran et al. 2012). YlmG scheint an der Verteilung der Nukleoide beteiligt zu sein (Kabeya et al. 2010). So führte eine Überexpression von YlmG zu einer filamentösen Struktur der Nukleoide, während ein *knock-down* des *YlmG*-Gens zu wenigen vergrößerten Nukleoiden führte.

1.6 Die Familie der WHIRLY-Proteine

Die WHIRLY-Proteine gehören zu einer kleinen für Pflanzen charakteristischen Proteinfamilie, die innerhalb der Angiospermen zu finden ist. Darüber hinaus konnten phylogenetische Untersuchungen zeigen, dass WHIRLY-ähnliche Vorläuferproteine, die eine

geringe Sequenzähnlichkeit zu den WHIRLY-Proteinen der Höheren Pflanzen aufweisen, auch in der Grünalge *C. reinhardtii*, einer terrestrischen Alge *Klebsormidium flaccidum* (*K. flaccidum*) und dem Lebermoos *Marchantia polymorpha* (*M. polymorpha*) zu finden sind (Kobayashi et al. 2016a). WHIRLY-ähnliche Proteine konnten jedoch nicht in Cyanobakterien identifiziert werden, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die WHIRLY-Proteine eukaryotischen Ursprungs sind.

In den Höheren Pflanzen verfügen die meisten Arten über zwei WHIRLY-Proteine, WHIRLY1 und WHIRLY2. In wenigen Arten, die ausschließlich in der Familie der Brassicaceae (Kreuzblütler) zu finden sind (Abb. 3), konnte bisher ein weiteres WHIRLY-Protein, WHIRLY3, identifiziert werden.

1.6.1 Entdeckung und strukturelle Charakteristika der WHIRLY-Proteine

Das erste WHIRLY-Protein wurde in der Kartoffel (*Solanum tuberosum*, *S. tuberosum*) identifiziert und im Hinblick auf sein Molekulargewicht von 24 kDa als p24 bezeichnet (Desveaux et al. 2000). 2002 konnte mit Hilfe von Röntgenkristallstrukturanalysen gezeigt werden, dass sich vier p24 Monomere zu einem Tetramer oligomerisieren können (Desveaux et al. 2002). Ein Monomer besteht dabei aus drei α -Helices und zwei antiparallel angeordneten β -Faltblättern, wobei jedes β -Faltblatt aus vier β -Strängen aufgebaut ist. Über ein Helix-Loop-Helix-Motiv am C-Terminus der Monomere ist die Ausbildung und Stabilisierung der Tetramere möglich. Durch die Oligomerisierung zu einem Tetramer entsteht eine wirbelförmige Quartärstruktur, mit einer hydrophilen Pore, wobei die drei α -Helices nach innen zur Pore und die β -Faltblätter nach außen gerichtet sind. Auf Grund dieser Quartärstruktur wurde die Bezeichnung in WHIRLY-Proteine (WHY-Proteine) geändert, so dass p24 in StWHIRLY1 (WHIRLY1-Protein von *S. tuberosum*) umbenannt wurde. Die Bildung von Tetrameren konnte zudem für das zu StWHIRLY1 homologe Protein StWHIRLY2 gezeigt werden (Cappadocia et al. 2010), so dass vermutet wurde, dass diese Quartärstruktur auch von WHIRLY-Proteinen aus anderen Arten ausgebildet werden kann (Desveaux et al. 2004). Zusätzlich konnte mittels Rasterkraftmikroskopie gezeigt werden, dass sich in Anwesenheit von langen einzelsträngigen DNA-Molekülen sechs StWHIRLY2-Tetramere zu einem 24-mer assemblieren können, wodurch eine im Inneren hohle Proteinkugel entsteht, die dem strukturellen Aufbau des menschlichen Ferritins ähnelt (Cappadocia et al. 2012). Diese Struktur könnte die Bindung von Metaboliten oder Nukleinsäuren begünstigen.



Abb. 3: Phylogenetischer Stammbaum der WHIRLY-Proteine Höherer Pflanzen.

Für den Stammbaum wurden die Aminosäuresequenzen aller bisher bekannten WHIRLY-Proteine höherer Pflanzen mit Nukleinsäure-Bindemotiv (KGKAAAL) (NCBI Datenbank) zu Grunde gelegt. Der Stammbaum wurde mit Geneious (ClustalW) erstellt. Die WHIRLY-Proteine lassen sich in zwei Gruppen einteilen. Die WHIRLY1- und WHIRLY3-Proteine sind in der unteren Gruppe, alle WHIRLY2-Proteine in der oberen Gruppe zu finden. Die acht bekannten WHIRLY3-Proteine sind blau, die WHIRLY1- und WHIRLY2-Proteine monokotyler Pflanzenarten sind rot markiert.

Fortsetzung Abbildungsunterschrift zu Abb. 3: Aa, *Arabis alpina*; Ac, *Ananas comosus*; Al, *Arabidopsis lyrata*; At, *Arabidopsis thaliana*; Ata, *Aegilops tauschii*; Atr, *Amborella trichopoda*; Bd, *Brachypodium distachyon*; Bs, *Brachypodium sylvaticum*; Bn, *Brassica napus*; Bo, *Brassica oleracea*; Br, *Brassica rapa*; Bv, *Beta vulgaris*; Ca, *Cicer arietinum*; Cc, *Citrus clementina*; Cca, *Coffea canephora*; Cm, *Cucumis melo*; Cs, *Camelina sativa*; Csa, *Cucumis sativus*; Csi, *Citrus sinensis*; Cr, *Capsella rubella*; Eg, *Erythranthe guttatus*; Egr, *Eucalyptus grandis*; Egu, *Elaeis guineensis*; Es, *Eutrema salsugineum*; Fv, *Fragaria vesca*; Gau = *Genlisea aurea*; Gm, *Glycine max*; Hv, *Hordeum vulgare*; Jc, *Jatropha curcas*; Lj, *Lotus japonicus*; Ma, *Musa acuminata*; Md, *Malus domestica*; Mt, *Medicago truncatula*; Nn, *Nelumbo nucifera*; Ob, *Oryza brachyantha*; Os, *Oryza sativa*; Pb, *Pyrus x bretschneideri*; Pd, *Phoenix dactylifera*; Pe, *Populus euphratica*; Pm, *Prunus mume*; Pp, *Prunus persica*; Pt, *Populus trichocarpa*; Pv, *Phaseolus vulgaris*; Sb, *Sorghum bicolor*; Si, *Setaria italica*; Sin, *Sesamum indicum*; Sl, *Solanum lycopersicum*; So, *Spinacia oleracea*; St, *Solanum tuberosum*; Tc, *Theobroma cacao*; Th, *Tarenaya hassleriana*; Tu, *Triticum urartu*; Va, *Vigna angularis*; Vv, *Vitis vinifera*; Zm, *Zea mays*; Zma, *Zostera marina*.

Die WHIRLY-Proteine sind im Zellkern kodiert und verfügen über eine charakteristische konservierte WHIRLY-Domäne (Abb. 4). Innerhalb dieser Domäne ist ein Nukleinsäure-Bindemotiv mit der Aminosäuresequenz Lys-Gly-Lys-Ala-Ala-Leu (KGKAAL) zu finden, mit der WHIRLY-Proteine einzelsträngige DNA binden können (Desveaux et al. 2002). Zudem ist das zweite im KGKAAL-Motiv lokalisierte Lysin für die Assemblierung und Stabilisierung von 24-meren verantwortlich (Cappadocia et al. 2012). Darüber hinaus sind am C-Terminus zwei vorhergesagte Motive beschrieben, eine vorhergesagte Autoregulationsdomäne und ein Kupferbindemotiv, wobei das Kupferbindemotiv nicht in allen WHIRLY-Proteinen zu finden ist (Isemer 2013). Des Weiteren verfügen alle WHIRLY-Proteine über eine N-terminale Importsequenz für die Plastiden bzw. Mitochondrien (Abb. 4).

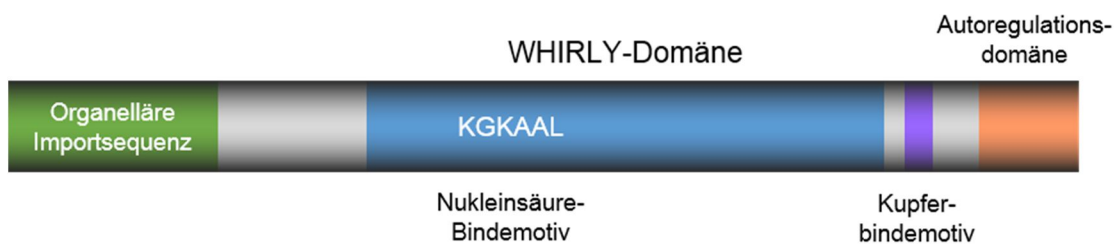


Abb. 4: Schematische Darstellung eines WHIRLY-Proteins.

In grün ist die organelläre Importsequenz und in blau die WHIRLY-Domäne mit dem Nukleinsäure-Bindemotiv (KGKAAL) dargestellt. Das vorhergesagte Kupferbindemotiv ist violett und die vorhergesagte Autoregulationsdomäne ist orange markiert.

1.6.2 Subzelluläre Lokalisation der WHIRLY-Proteine

Das WHIRLY1-Protein der Kartoffel wurde erstmals als Transkriptionsfaktor im Zellkern beschrieben (Després et al. 1995; Desveaux et al. 2000; 2002; 2004). Darüber hinaus zeigten Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation des WHIRLY1-, WHIRLY2- und WHIRLY3-Proteins von Arabidopsis (AtWHIRLY1, -2, -3), dass die WHIRLY-Proteine auch in den Organellen der Pflanzenzellen akkumulieren. Die Lokalisation erfolgte mit Hilfe von

GFP-Fusionskonstrukten (*green fluorescent protein*), die transient in Kartoffelprotoplasten bzw. Zwiebelepidermiszellen transformiert wurden (Krause et al. 2005). Dabei konnte gezeigt werden, dass AtWHIRLY1 und AtWHIRLY3 in den Plastiden und AtWHIRLY2 in den Mitochondrien lokalisiert ist. Für keines der drei WHIRLY-Proteine konnte in Fusion mit GFP eine Akkumulation im Zellkern beobachtet werden (Krause et al. 2005). WHIRLY-Proteine verfügen über keine Kernlokalisationssequenz (*nuclear localization sequence*, NLS), so dass der Import in den Zellkern passiv über Diffusion erfolgen muss. Für diesen passiven Transport über die Kernporen müssen die Proteine ein Molekulargewicht von weniger als 50 kDa besitzen (Poon & Jans 2005). Im Fall der GFP-markierten WHIRLY-Proteine wird diese Ausschlussgröße allerdings überschritten, so dass ein passiver Import nicht mehr möglich ist, weshalb die GFP-markierten WHIRLY-Proteine trotz möglicher Kernlokalisierung nicht im Zellkern akkumulieren können. Die Lokalisation von AtWHIRLY1 und AtWHIRLY2 in den Plastiden bzw. Mitochondrien wurde *in vitro* mit Hilfe von Importexperimenten bestätigt, wobei AtWHIRLY2 sowohl in die Mitochondrien als auch in die Chloroplasten importiert werden konnte (Krause et al. 2005).

Die Identifizierung von StWHIRLY1 als nukleärer Transkriptionsfaktor und die subzelluläre Lokalisation des homologen AtWHIRLY1-Proteins in den Plastiden (Després et al. 1995; Desveaux et al. 2000; 2002; 2004; Krause et al. 2005), deutete auf eine duale Verteilung von WHIRLY1-Proteinen hin. Die duale Lokalisation von WHIRLY1 in den Plastiden und im Zellkern derselben Zelle konnte für das WHIRLY1-Protein der Gerste (HvWHIRLY1) durch Western Blot und Immunogoldmarkierungen an Ultradünnschnitten gezeigt werden (Grabowski et al. 2008). Immunologische Untersuchungen ergaben zudem, dass das HvWHIRLY1-Protein in den Plastiden und dem Zellkern das Molekulargewicht des reifen Proteins hat. Mit Hilfe von Plastomtransformanten des Tabaks, in denen ein HA-markiertes AtWHIRLY1-Protein synthetisiert wird, war es zudem möglich die Umverteilung des reifen WHIRLY1-Proteins aus den Plastiden in den Zellkern zu zeigen (Isemer et al. 2012).

Das AtWHIRLY3-Protein konnte *in vitro* zusammen mit dem AtWHIRLY1-Protein im Komplex KBF-1 (*KPRE-binding factor 1*) identifiziert werden, der im Zellkern an der transkriptionellen Regulation des *Kinesin*-Gens beteiligt ist (Xiong et al. 2009), so dass auch für AtWHIRLY3 eine duale Lokalisation denkbar wäre. Ein direkter Nachweis im Zellkern steht aber noch aus.

Die Fähigkeit der WHIRLY-Proteine sich zu Oligomeren zu assemblieren, wurde bereits erwähnt. *In vivo* konnte die Bildung von Homooligomeren mit Hilfe von bimolekularer Fluoreszenzkomplementation in transient transformierten Zwiebelepidermiszellen für die WHIRLY1-Proteine von Arabidopsis und Gerste im Zellkern beobachtet werden (Grabowski et al. 2008). Ob es sich bei den Homooligomeren um Tetra- oder 24-mere handelt, bleibt jedoch ungeklärt. Außerdem gibt es einen Hinweis für die Assemblierung von 24-meren in

den Chloroplasten (siehe hierzu auch 1.6.4). Demnach konnten das AtWHIRLY1- und AtWHIRLY3-Protein durch Gelfiltration von Chloroplastenextrakten in hochmolekularen Komplexen, die dem 24-mer entsprechen könnten, nachgewiesen werden (Cappadocia et al. 2012).

1.6.3 Funktionen der WHIRLY-Proteine im Zellkern

Das WHIRLY1-Protein aus Kartoffel (p24) wurde erstmals als Transkriptionsfaktor für das *PR-10a*-Gen (*pathogenesis-related*) beschrieben (Després et al. 1995; Desveaux et al. 2000). *PR*-Gene kodieren für *PR*-Proteine, die an der Pathogenabwehr in Pflanzen beteiligt sind. Die Expression der *PR*-Gene wird nach dem Kontakt mit einem Pathogen bzw. einem Elicitor ausgelöst (van Loon & van Strien 1999). Nach Infektion mit einem Pathogen kommt es zu einer Elicitor-abhängigen Bindung von PBF-2 (*PR-10a binding factor*, StWHIRLY1-Tetramer) und weiterer Faktoren an den Promotor, wodurch die Transkription des *PR-10a*-Gens aktiviert wird (Després et al. 1995; Desveaux et al. 2000). Das StWHIRLY1-Tetramer bindet spezifisch an eine *inverted repeat* Sequenz (TGACAnnnnTGTC) innerhalb des 30 bp langen *elicitor response* Elements (ERE; ER-Element) im Promotor des *PR-10a*-Gens (Desveaux et al. 2000). Die sequenzspezifische Bindung des WHIRLY1-Tetramers bzw. -Monomers erfolgt dabei über einzelsträngige DNA (Desveaux et al. 2000). Weitere Untersuchungen zur transkriptionellen Aktivierung des *PR-10a*-Gens konnten zeigen, dass bereits eine kürzere Nukleinsäuresequenz (GTCAAAA) für die Induktion der Transkription ausreichend ist (Desveaux et al. 2004). Außerdem scheint die Bindung von WHIRLY1 an das ER-Element abhängig von Salicylsäure zu sein, die nach Infektion mit einem Pathogen synthetisiert wird (Desveaux et al. 2004). Für die Bindung an einzelsträngige DNA wird das Motiv mit der Aminosäureabfolge KGKAAL benötigt (Desveaux et al. 2002), welches innerhalb der WHIRLY-Domäne liegt und bei fast allen WHIRLY-Proteinen zu finden ist. Zudem wurde mit Hilfe eines rekombinant exprimierten partiellen HvWHIRLY1-Proteins die Bindung an einzelsträngige DNA bestätigt (Krupinska et al. 2014b). Bei den durchgeführten *electrophoretic mobility shift assays* (EMSA) konnte auch die Bindung von HvWHIRLY1 an doppelsträngige DNA nachgewiesen werden, wobei die Bindung an doppelsträngige DNA schwächer als an einzelsträngige DNA erfolgte.

Nicht nur WHIRLY-Proteine von Arabidopsis, sondern auch das WHIRLY1-Protein der Gerste konnte als Transkriptionsfaktor für nukleäre Gene identifiziert werden (Després et al. 1995; Desveaux et al. 2000; Xiong et al. 2009; Krupinska et al. 2014b). So reguliert HvWHIRLY1 die Expression des *S40*-Gens (*senescence associated gene 40*), welches in der Gerste bei der Induktion der Seneszenz eine Rolle spielt (Krupinska et al. 2014b).

Des Weiteren wurde für das AtWHIRLY1-Protein gezeigt, dass es an einzelsträngige Telomersequenzen bindet und an der Aufrechterhaltung der Telomer-Homöostase beteiligt ist (Yoo et al. 2007). Die Bindung von AtWHIRLY1 erfolgt spezifisch an eine repetitive Sequenz der Telomere. Studien mit WHIRLY1-Überexpressionslinien bzw. *whirly1*-Mutanten deuten darauf hin, dass AtWHIRLY1 die Telomeraseaktivität negativ beeinflusst, was auf eine verringerte Zugänglichkeit der Telomere nach Bindung des AtWHIRLY1-Proteins zurück zu führen sein könnte. In Gerste konnte die Bindung des WHIRLY1-Proteins an einzelsträngige Telomersequenzen *in vitro* ebenfalls bestätigt werden (Kilbiński 2007).

1.6.4 Funktionen der WHIRLY-Proteine in den Organellen

Die Lokalisation der WHIRLY-Proteine von Arabidopsis, AtWHIRLY1, -2 und -3, in den Chloroplasten bzw. Mitochondrien ließ vermuten, dass WHIRLY-Proteine Funktionen in den Organellen erfüllen (Krause et al. 2005). Dieses Ergebnis wurde durch die Identifizierung des AtWHIRLY1- und des AtWHIRLY3-Proteins im TAC von Chloroplasten untermauert, so dass eine Funktion in Zusammenhang mit Nucleinsäuren in den Plastiden wie für das WHIRLY1-Protein im Zellkern wahrscheinlich wurde (Pfalz et al. 2006). Auch HvWHIRLY1 konnte im Transkriptionsaktiven Chromosom nachgewiesen werden (Melonek et al. 2010). Aus Gerste wurden zwei TAC-Fraktionen, TAC-I und TAC-II, isoliert, wobei TAC-II eine hochaufgereinigte Fraktion, die aus TAC-I gewonnen wurde, darstellt. Das HvWHIRLY1-Protein konnte nur in der TAC-I-Fraktion, nicht aber in der weiter aufgereinigten TAC-II-Fraktion identifiziert werden, weshalb vermutet wurde, dass WHIRLY1 keine zentrale Komponente darstellt, sondern nur in der Peripherie von TAC zu finden ist (Melonek et al. 2010). Proteomanalysen von Nucleoiden zeigten darüber hinaus, dass das WHIRLY1-Protein eine Hauptkomponente der Nucleoide des Maises ist (Majeran et al. 2012). Von 1092 identifizierten nucleoidassoziierten Proteinen gehörte WHIRLY1 des Maises (ZmWHIRLY1) zu den 28 abundantesten Proteinen. Die Lokalisation von plastidären WHIRLY-Proteinen in den Nucleoiden konnte auch in Arabidopsis sowohl für AtWHIRLY1 als auch für AtWHIRLY3 gezeigt werden (Huang et al. 2013). Kollisationsstudien mit dem nucleoidassoziierten Protein PEND und dem WHIRLY1-Protein der Gerste ergaben, dass WHIRLY1 nur mit einem Teil der Nucleoide, in denen PEND enthalten ist, kollalisiert (Melonek et al. 2010). Im Unterschied dazu konnte in der Kartoffel der Großteil des WHIRLY1-Proteins mit den Nucleoiden, welche mit einem DNA-spezifischen Farbstoff angefärbt wurden, kollalisiert werden (Maréchal et al. 2009).

Mit Hilfe von Subfraktionierungen von Chloroplasten wurde für das WHIRLY1-Protein von Mais und Gerste gezeigt, dass es sowohl im Stroma als auch an den Thylakoidmembranen zu finden ist (Prikryl et al. 2008; Melonek et al. 2010). Durch DNase-Behandlung der

Thylakoide konnte WHIRLY1 von den Thylakoiden abgetrennt werden (Prikryl et al. 2008). Die Assoziation von WHIRLY1 mit den Thylakoiden wird somit durch DNA bzw. durch die plastidären Nukleotide vermittelt, welche in den Chloroplasten an der Thylakoidmembran gebunden sind (Liu & Rose 1992; Prikryl et al. 2008). Wie bereits für das WHIRLY1-Protein im Zellkern gezeigt werden konnte, kann es auch in den Plastiden an DNA binden. DIP-Chip-Analysen (*DNA immunoprecipitation Chip*) ermöglichten den Nachweis, dass WHIRLY1 unabhängig von der Sequenz an die ptDNA bindet (Prikryl et al. 2008). Untersuchungen mit rekombinantem WHIRLY1-Protein von Mais und Gerste konnten die Bindung an einzel- sowie doppelsträngige DNA *in vitro* bestätigen (Prikryl et al. 2008; Krupinska et al. 2014b). Ebenfalls wurde eine Bindung an einzelsträngige DNA sowohl für das WHIRLY1- als auch für das WHIRLY3-Protein von Arabidopsis nachgewiesen (Maréchal et al. 2009). 4,6 % der Nachkommen einer *whirly1/3*-Doppelmutante weisen variierte Blätter auf. In diesen hellen Blattbereichen kommt es durch das Fehlen der WHIRLY-Proteine zu vermehrten fehlerhaften Rekombinationen in der ptDNA, wodurch DNA-Bereiche neu arrangiert werden. Dadurch entstehen sogenannte Subgenome, die parallel zum plastidären Genom in den Plastiden existieren (Maréchal et al. 2009; Cappadocia et al. 2010). Die beiden Arabidopsis-Proteine werden deshalb als Antirekombinationsproteine beschrieben und scheinen an der Aufrechterhaltung der Genomstabilität in den Plastiden beteiligt zu sein. Es werden zwei Mechanismen beschrieben, mit denen plastidäre WHIRLY-Proteine die ptDNA vor illegitimen Rekombinationen schützen. Die WHIRLY-Proteine könnten nach einem Doppelstrangbruch einzelsträngige DNA-Bereiche der ptDNA binden und dadurch stabilisieren (Maréchal et al. 2009) oder sie binden die bei der Reparatur von Doppelstrangbrüchen ausgeschnittenen DNA-Sequenzen und verhindern so eine mögliche Rekombination dieser Sequenzen mit der ptDNA (Cappadocia et al. 2010). Für den Schutz der ptDNA vor illegitimen Rekombinationen scheint das zweite Lysin innerhalb des Nukleinsäure-Bindemotivs (KGKAAL) nötig zu sein, welches in allen WHIRLY-Proteinen konserviert ist (Cappadocia et al. 2012). Außerdem ist das Lysin an der Oligomerisierung von sechs WHIRLY-Tetrameren zu 24-meren beteiligt, was darauf hindeutet, dass eine 24-mer-Struktur der WHIRLY-Proteine unerlässlich für die Funktion als Antirekombinationsprotein zu sein scheint. Durch die 24-mer-Bildung ist das WHIRLY-Oligomer in der Lage, lange DNA-Sequenzen zu binden. Durch eine Mutation des zweiten Lysins geht diese Fähigkeit jedoch verloren, während die Bindung von kurzen einzelsträngigen DNA-Molekülen noch möglich ist. Auch die Proteinstruktur bleibt durch die Mutation unbeeinflusst.

Neben der Bindung an ptDNA konnte das ZmWHIRLY1-Protein mit verschiedenen plastidären RNAs, u. a. der RNA des intronhaltigen Gens *atpF*, koimmunpräzipitiert werden (Prikryl et al. 2008). Auch für das HvWHIRLY1-Protein konnte eine Assoziation an RNAs, deren Gene Intronen enthalten, bestätigt werden (Melonek et al. 2010). Da nur einige

plastidäre RNAs von WHIRLY1 gebunden werden, scheint die Bindung an RNAs im Unterschied zu der an ptDNA selektiv zu erfolgen (Prikryl et al. 2008; Melonek et al. 2010). Da in *knock-down*-Mutanten von Mais und Gerste für das *WHIRLY1*-Gen eine verstärkte Akkumulation an ungespleißten RNA-Vorstufen beobachtet werden konnte, ist eine Beteiligung von WHIRLY1 am Spleißen der RNAs wahrscheinlich (Prikryl et al. 2008; Melonek et al. 2010). *Run-on*-Transkriptionsanalysen mit denselben Mutanten zeigten keine Veränderungen in den Transkriptmengen plastidärer Gene, so dass WHIRLY1 keinen Einfluss auf die Transkription, sondern auf den RNA-Metabolismus zu haben scheint. Die Bindung an einzelsträngige RNA *in vitro* konnte mit rekombinantem ZmWHIRLY1-Protein bestätigt werden (Prikryl et al. 2008).

Wie für die plastidär lokalisierten WHIRLY1- und WHIRLY3-Proteine konnte auch für das in den Mitochondrien lokalisierte WHIRLY2-Protein aus Kartoffel und Arabidopsis eine Bindung an DNA nachgewiesen werden (Vermel et al. 2002; Maréchal et al. 2008), wobei die Bindung unabhängig von der Sequenz erfolgt (Maréchal et al. 2008; Tarasenko et al. 2012). Außerdem konnte gezeigt werden, dass WHIRLY2 *in vitro* an einzelsträngige DNA bindet (Vermel et al. 2002; Tarasenko et al. 2012) und dass WHIRLY2 in Pollen mit der mtDNA, die mit DAPI angefärbt war, kolokalisiert (Cai et al. 2015). Arabidopsis-Pflanzen, die das *WHIRLY2*-Gen konstitutiv überexprimieren, weisen ein geringeres Wachstum, eine verfrühte Seneszenz und Störungen in der Funktion der Mitochondrien auf (Maréchal et al. 2008). Die Störung ist auf eine reduzierte Menge mitochondrialer DNA (mtDNA) zurückzuführen und geht mit einer geringeren Menge mitochondrialer Transkripte einher, was sowohl die Struktur der Mitochondrien als auch die Aktivität der Atmungskette beeinträchtigt. Dazu stehen Ergebnisse von Arabidopsis-Überexpressionslinien, die das *WHIRLY2*-Gen nur in den Pollen exprimieren (Cai et al. 2015), im Widerspruch. In diesen Pollen konnte eine 10-fach erhöhte Menge an mtDNA und eine verstärkte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) gemessen werden. Im Unterschied dazu nahm der Gehalt an mtDNA und WHIRLY2-Protein während der normalen Pollenentwicklung ab. Wurde ein im Nukleinsäure-Bindemotiv mutiertes *WHIRLY2*-Gen (KGKAAL wurde gegen QGQGGV ausgetauscht) in den Pollen überexprimiert, konnte kein erhöhter Gehalt an mtDNA mehr nachgewiesen werden, so dass zwischen dem Nukleinsäure-Bindemotiv und der Menge an mtDNA ein Zusammenhang bestehen könnte.

1.7 Zielsetzung

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit ist, zu klären, welche Rolle das abundante DNA/RNA-Bindeprotein WHIRLY1 der Gerste in den Nukleoiden der Plastiden spielt. Dazu soll der Einfluss von HvWHIRLY1 auf die Nukleoide in transgenen Gerstenpflanzen, die über eine reduzierte HvWHIRLY1-Proteinmenge verfügen, und Wildtyp-Pflanzen der Gerste vergleichend untersucht werden. Die Analysen an Pflanzen sollen durch heterologe Expressionsstudien in *E. coli* und durch Untersuchungen zur Nukleoidstruktur in den Bakterien ergänzt werden. Außerdem soll die Frage geklärt werden, ob die plastidären WHIRLY-Proteine aus Mais und Arabidopsis die gleichen Funktionen in den Nukleoiden erfüllen können wie HvWHIRLY1.

Plastidäre Nukleoide weisen entwicklungs- und umweltabhängige Veränderungen hinsichtlich der Proteinzusammensetzung sowie ihrer Verteilung innerhalb der Plastiden während der Chloroplastenentwicklung auf. Ein weiteres Ziel der Arbeit ist, zu prüfen, ob HvWHIRLY1 an der Regulation der entwicklungs- und umweltabhängigen Veränderungen der Nukleoide beteiligt ist. Zur Untersuchung entwicklungsabhängiger Veränderungen sollen Gerstenprimärblätter, die wie alle monokotylen Pflanzen einen Gradienten der Chloroplastenentwicklung von der Basis zur Spitze aufweisen, genutzt werden. Zur Klärung, ob Umweltfaktoren einen Einfluss auf die Nukleoidstruktur von Pflanzen mit unterschiedlichen Mengen an HvWHIRLY1 haben, sollen Gerstenpflanzen nach Anzucht unter verschiedenen Lichtintensitäten analysiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien, Enzyme und Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden mit dem Reinheitsgrad zur Analyse (*p.a.*) von den Firmen Agrisera (Vännäs, Schweden), Bio-Rad (München), Duchefa (Haarlem, Niederlande), GE Healthcare (Freiburg), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (München) und Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) bezogen.

Alle Lösungen wurden mit deionisiertem Wasser, welches mit einer Millipore-Anlage (Seradest SD 2000, USF Elga Seral, Ransbach-Baumbach) entsalzt wurde, angesetzt.

Die verwendeten Enzyme (Restriktionsendonukleasen) wurden von der Firma Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) erworben.

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Sigma-Aldrich (München) synthetisiert. Die Stocklösungen (100 μM) und Arbeitslösungen (10 μM) wurden mit sterilem deionisiertem Wasser angesetzt und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Eine Auflistung der Oligonukleotide ist in den entsprechenden Kapiteln zu finden (Tab. 2, Tab. 4, Tab. 6 und Tab. 7).

Bei allen molekularbiologischen und proteinbiochemischen Arbeiten wurden die verwendeten Lösungen und Gerätschaften bei $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 20 Minuten autoklaviert.

2.2 Pflanzenmaterial

2.2.1 Anzucht von Gerste (*Hordeum vulgare*)

Für die Versuche wurde Saatgut von der Sommergerste *Hordeum vulgare* L. cv. Golden Promise und der WHIRLY1-RNAi-Linie 1 (W1-1) bzw. Linie 7 (W1-7) verwendet (Krupinska et al. 2014a). Die Pflanzen wurden auf Einheitserde ED73 (Einheitserdewerk Werner Tantau, Ütersen) angezogen und mit Leitungswasser gegossen. Nach der Aussaat erfolgte eine dreitägige Kälteinduktion bei $6\text{ }^{\circ}\text{C}$. Danach wurden die Pflanzen in einer Klimakammer im Dauerlicht bei einer Lichtintensität von 50 bzw. 140 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ im Schwachlicht oder bei 200 bzw. 440 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ im Hochlicht bei einer Temperatur von $21\text{ }^{\circ}\text{C}$ und einer Luftfeuchte von 65 % kultiviert.

2.2.2 WHIRLY1-RNAi-Linien

Die WHIRLY1-RNAi-Linien 1 (W1-1) und 7 (W1-7) wurden am IPK in Gatersleben von Dr. Götz Hensel und Dr. Jochen Kumlehn im Hintergrund der Sommergerste *Hordeum vulgare* L. cv. Golden Promise erstellt. Bei den beiden RNAi-Linien handelt es sich um *knock-down* Linien, die noch über eine geringe Menge an HvWHIRLY1-Protein verfügen. Nähere Informationen zur Erstellung und Selektion der beiden RNAi-Linien sind der Publikation Krupinska et al. (2014b) zu entnehmen.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Lösungen und Puffer

Die folgenden Lösungen und Puffer fanden in dieser Arbeit Verwendung:

1 x PBS:	8,1 mM	Na ₂ HPO ₄
	1,5 mM	NaH ₂ PO ₄
	150 mM	NaCl
	pH 7,5	
10 x Bromphenolblau:	50 %	Glycerin
	0,1 %	Bromphenolblau
10 x TAE-Puffer:	242 g/l	Tris
	57,1 ml/l	Essigsäure
	100 ml/l	0,5 M EDTA Stammlösung
	pH 8 mit HCl einstellen	
1 x TE-Puffer:	10 mM	Tris/HCl pH 8
	1 mM	EDTA
20 x SSC:	3 M	NaCl
	300 mM	Natriumcitrat pH 7

2.3.2 Medien

Alle in der vorliegenden Arbeit verwendeten Medien wurden mit deionisiertem Wasser angesetzt und vor dem Gebrauch autoklaviert.

LB-Medium:	10 g/l	NaCl
(Luria-Bertani-Medium)	10 g/l	Pepton
	5 g/l	Hefeextrakt
	(für LB-Platten: 15 g/l Agar)	
MacConkey-Medium:	40 g/l	BD Difco MacConkey Agar Base
(Schnetz et al. 1987)		(BD Diagnostics, Heidelberg)
	5 g/l	Salicin

Das Salicin wurde separat gelöst und ins autoklavierte Medium steriltrifert.

2.3.3 Arbeitstechniken mit Bakterien

2.3.3.1 Bakterienstämme

Alle in dieser Arbeit verwendeten *E. coli* Stämme basieren auf dem nicht pathogenen *E. coli* Stamm K12. Für die Klonierung von DNA-Fragmenten und zur Vervielfältigung von Plasmid-DNA wurden die *E. coli* Stämme DH5 α und XL10-Gold verwendet. Für die Expression heterologer Proteine wurden die *E. coli* Stämme DH5 α und SG13009 [pREP4] verwendet. Für Komplementationsversuche wurde der *E. coli* Stamm CSH50 und die *hupA/B-Mutante* (Berger et al. 2009) sowie der *E. coli* Stamm DH5 α und die *hns-Mutante* (Venkatesh et al. 2010) verwendet.

2.3.3.2 Anzucht von Bakterienkulturen

Die Anzucht aller Wildtyp *E. coli* Stämme erfolgte auf LB-Agarplatten (siehe 2.3.2) über Nacht bei 37 °C im Brutschrank (WTB Binder). *E. coli* Flüssigkulturen wurden in Reagenzgläsern oder Erlenmeyerkolben in flüssigem LB-Medium (siehe 2.3.2) ebenfalls über Nacht bei 37 °C und 180 UpM in einem Schüttelinkubator (Labshaker, InnovaTM4400) angezogen. Zur Selektion von transformierten Bakterien wurde dem Medium ein entsprechendes Antibiotikum zugesetzt.

Nachfolgend sind alle in der Arbeit zur Selektion verwendeten Antibiotika und die eingesetzte Konzentration im Medium aufgelistet:

Ampicillin	100 µg/ml
Kanamycin	25 µg/ml
Chloramphenicol	25 µg/ml

2.3.3.3 Herstellung chemisch-kompetenter *E. coli*-Zellen

Die chemisch-kompetenten Zellen wurden nach der CaCl₂-Methode von Cohen et al. (1972) hergestellt. Eine Einzelkolonie wurde über Nacht bei 37 °C und 130 UpM in 50 ml LB-Medium (siehe 2.3.2) angezogen. Zum Animpfen der 500 ml Hauptkultur (vorgewärmtes LB-Medium) wurden 5 ml der Übernachtskultur verwendet. Die Hauptkultur wurde bis zum Erreichen der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD₆₀₀) von 0,6 bei 37 °C und 180 UpM angezogen. Die optische Dichte der Bakteriensuspension wurde photometrisch an einem Spektralphotometer (Shimadzu, UV-2501PC, Spectrophotometer, Duisburg) gegen LB-Medium gemessen. Anschließend wurde die Bakteriensuspension langsam schwenkend für 45 Minuten auf Eis heruntergekühlt und für 10 Minuten bei 5.000 UpM und 4 °C zentrifugiert (Centricon T-124, KONTRON Instruments, Rossdorf Kontron; Rotor A6.14). Die Zellen wurden in 100 ml kalter 0,1 M MgCl₂-Lösung resuspendiert und erneut für 5 Minuten bei 5.000 UpM und 4 °C zentrifugiert (Centrifuge 5804 R, Eppendorf, Hamburg). Anschließend wurden die Bakterienzellen in 100 ml kalter 0,1 M CaCl₂-Lösung aufgenommen, für 30 Minuten auf Eis schüttelnd inkubiert und für 5 Minuten bei 5.000 UpM und 4 °C zentrifugiert. Die Zellen wurden in 12,5 ml kalter CaCl₂/Glycerin-Lösung (12,9 ml 0,1 M CaCl₂, 2,1 ml 100 % (v/v) Glycerin) resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde á 100 µl aliquotiert, in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.3.3.4 Transformation von kompetenten *E. coli*-Zellen

Die Transformation der *E. coli* Stämme erfolgte mittels Hitzeschock. Für die Transformation wurden die auf Eis aufgetauten Zellen mit 1 ng Plasmid-DNA oder dem Ligationsansatz (siehe 2.3.7.2) versehen und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der Hitzeschock für 30 Sekunden bei 42 °C. Die Zellen wurden nach dem Hitzeschock sofort für 2 Minuten auf Eis überführt. Durch Zugabe von 250 µl LB-Medium (siehe 2.3.2) sowie Inkubation für 1 Stunde bei 37 °C und 180 UpM erfolgte die Regeneration der Zellen. Danach wurden die Zellen auf LB-Agarplatten mit dem zur Selektion benötigtem Antibiotikum (2.3.3.2) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C angezogen.

2.3.3.5 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Zellen erfolgte nach dem Protokoll von Birnboim und Doly (1979). Sollte die Plasmid-DNA im Anschluss an die Isolierung sequenziert werden, wurde sie mit Hilfe des *Roti®-Prep Plasmid MINI Kits* (Roth, Karlsruhe) nach Angaben des Herstellers präpariert.

Zur Isolierung der Plasmid-DNA nach Birnboim und Doly wurden zunächst 1,5 ml einer Übernachtskultur (siehe 2.3.3.2) für 1 Minute bei 13.200 UpM zentrifugiert (Tischzentrifuge MiniSpin®, Eppendorf, Hamburg). Die pelletierten Bakterien wurden in 100 µl kalter Lösung 1 resuspendiert und für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 200 µl Lösung 2 hinzugegeben, der Ansatz wurde sechsmal durch Invertieren gemischt und erneut für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Bei diesem Schritt kommt es zur alkalischen Lyse der Bakterien. Durch Zugabe von 150 µl 3 M Natriumacetat (pH 4,8–6,0), sechsmaliges Invertieren und Zentrifugation für 15 Minuten bei 13.200 Upm und Raumtemperatur wurden Lipide, Proteine und die hochmolekulare chromosomale DNA ausgefällt, während die Plasmid-DNA im Überstand verblieb. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit dem 0,7-fachen Volumen Isopropanol gemischt und für 15 Minuten bei 13.200 Upm und Raumtemperatur zentrifugiert, wobei es zur Fällung der Plasmid-DNA kam. Die pelletierte Plasmid-DNA wurde mit 400 µl 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20 µl 1 x TE-Puffer (2.3.1) resuspendiert. Durch Zugabe von 10 µg RNase A (Roth, Karlsruhe) und einer 30-minütigen Inkubation bei 37 °C erfolgte die Restriktion von RNA.

Lösung 1:	50 mM	Glukose
	25 mM	Tris/HCl pH 8
	10 mM	EDTA
Lösung 2:	0,2 M	NaOH
	1 % (w/v)	SDS
	frisch vor dem Gebrauch anmischen	

2.3.3.6 Anlegen von Gefrierkulturen

Das Anlegen von Gefrierkulturen diente der langfristigen Lagerung von Bakterienkulturen. Dazu wurden 1,5 ml einer Übernachtskultur (siehe 2.3.3.2) bei 10.000 UpM für 1 Minute abzentrifugiert (Tischzentrifuge MiniSpin®, Eppendorf, Hamburg), die Zellen in 500 µl restlichem Medium resuspendiert, mit 250 µl 80 %igem (v/v) Glycerin gemischt und bei –80 °C gelagert.

2.3.3.7 Heterologe Überexpression von *WHIRLY*-Genen in *E. coli*

Die Wachstumsversuche wurden mit dem Vektor pASK-IBA3 (IBA, Göttingen) in *E. coli* DH5 α durchgeführt. Für die Wachstumsversuche wurde am Vortag eine Einzelkolonie des rekombinanten Klons in 5 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum angezogen (siehe 2.3.3.2). Am darauffolgenden Tag wurden 1,5 ml der Übernachtskultur zum Animpfen einer Hauptkultur (50 ml) verwendet. Die optische Dichte der Hauptkultur wurde stündlich photometrisch bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD_{600}) gemessen (Shimadzu, UV-2501PC, Spectrophotometer, Duisburg). Die Hauptkultur wurde bis zum Erreichen einer $OD_{600} = 0,6$ bei 37 °C und 180 UpM angezogen, dann erfolgte die Induktion der Überproduktion des rekombinanten Proteins durch Zugabe von 0,2 μ M Anhydrotetracyclin (IBA, Göttingen). Die Induktion der Überexpression mittels Anhydrotetracyclin basiert darauf, dass sich das Gen für das zu überexprimierende Proteine im pASK-IBA3-Vektor unter der Kontrolle des Tetracyclin-induzierbaren Promotors befindet. Anhydrotetracyclin bindet an den Promotor und induziert diesen, so dass es zur Transkription des dahinter liegenden Gens kommt. Nach der Induktion wurde die Hauptkultur weitere 6–22 Stunden bei 37 °C und 180 UpM kultiviert und die OD_{600} weiterhin stündlich am Spektralphotometer ermittelt.

Zur Analyse der Überexpression mittels SDS-PAGE (siehe 2.4.8) wurde stündlich 1 ml Kultur abgenommen. Die Zellen wurden für 1 Minute bei 13.200 UpM (Tischzentrifuge MiniSpin®, Eppendorf, Hamburg) pelletiert, das Medium wurde restlos abgenommen und die pelletierten Zellen bis zur weiteren Verwendung bei –20 °C gelagert.

Für die Protein-Synthese mit dem Ziel der Aufreinigung rekombinanter Proteine wurde der Vektor pQE30 (Qiagen, Hilden) in *E. coli* SG13009 [pREP4] verwendet. Vorgewärmtes LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika (siehe 2.3.3.2) wurde mit einer über Nacht angezogenen Vorkultur des rekombinanten Klons angeimpft. Die Zellen wurden bis zu einer OD_{600} von 0,6 angezogen. Dann erfolgte die Induktion der Überexpression des rekombinanten Proteins durch Zugabe von 1 mM Isopropyl- β -D-thiogalactosid (IPTG). IPTG bindet dabei das an den T5-Promotor gebundene Repressorprotein *lac*, wodurch dieses inaktiviert und die Expression des zu überexprimierenden Gens induziert wird. Nach der Induktion wurde die Hauptkultur weitere 4 Stunden bei 37 °C und 180 UpM kultiviert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation für 20 Minuten bei 4.000 x g und 4 °C pelletiert (Centrifuge 5804 R, Eppendorf, Hamburg).

2.3.3.8 Färbung bakterieller Nukleotide mit DAPI

Zur Visualisierung bakterieller Nukleotide nach Induktion rekombinanter Proteine wurde der fluoreszierende DNA-Farbstoff 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) verwendet. 1 ml Kultur der

zu untersuchenden *E. coli*-Zellen wurde 2 Stunden nach der Induktion der Überexpression (siehe 2.3.3.7) von der Hauptkultur abgenommen und für 1 Minute bei 10.000 UpM (Tischzentrifuge MiniSpin®, Eppendorf, Hamburg) pelletiert. Die pelletierten Zellen wurden 2 x in 1 ml 1 x PBS (2.3.1) gewaschen und anschließend vorsichtig in 500 µl 1 x PBS resuspendiert. Die Zellen wurden auf einem Objektträger 1:1 mit einer 1 µg/ml DAPI-Lösung gemischt und am Axiophot (Zeiss, Feldbach, Schweiz) mit einem 100 x Öbobjektiv (Plan-APOCHROMAT 100x/1,4 Oil Ph3, Zeiss, Feldbach, Schweiz) unter Verwendung des Zeiss Filtersatzes 02 (Anregung: G365, Strahlteiler FT: 395, Emission: 420 LP) mikroskopiert. Die Aufnahmen erfolgten mit der Olympus DP71 Kamera und der Software *cell^F* (Olympus Europe).

2.3.3.9 Komplementationsversuche mit *E. coli*-Mutanten

Für Komplementationsversuche wurden die nachfolgend aufgelisteten *E. coli*-Mutanten verwendet.

hupA/B: Mutante für das *hupA*- und *hupB*-Gen, welche für das HU α - bzw. HU β -Protein von *E. coli* kodieren. In der *hupA/B*-Mutante ist das HU α -Protein gegen eine Chloramphenicol-Resistenzkassette und das HU β -Protein gegen eine Kanamycin-Resistenzkassette ausgetauscht worden (Berger et al. 2009). Die *hupA/B*-Mutante wurde auf LB-Agarplatten mit 25 µg/ml Kanamycin und 25 µg/ml Chloramphenicol angezogen. Nach Transformation des pASK-IBA3-Vektors bzw. des pASK-IBA3/HvWHY1-Konstruktes wurde den LB-Agarplatten zur Selektion zudem 100 µg/ml Ampicillin zugesetzt. Zum Nachweis einer Komplementation wurden die Zellen in einem Brutschrank (WTB Binder) bei 37 °C bzw. 25 °C angezogen. Während die *hupA/B*-Mutante bei 37 °C ein normales Wachstum zeigt, ist ein Wachstum bei 25 °C nicht möglich. Erst nach erfolgreicher Komplementation kann die *hupA/B*-Mutante bei 25 °C wachsen. Die *hupA/B*-Mutante wurde im Wildtyp *E. coli* Stamm CSH50 erzeugt, so dass dieser Stamm als Kontrolle diente (Berger et al. 2009).

hns: Mutante für das *hns*-Gen, welches für das H-NS-Protein kodiert. Die Anzucht der *hns*-Mutante erfolgte auf MacConkey-Agarplatten über Nacht bei 37 °C. Nach Transformation des pASK-IBA3-Vektors bzw. des pASK-IBA3/HvWHY1-Konstruktes wurde den MacConkey-Agarplatten zur Selektion 100 µg/ml Ampicillin zugesetzt. Der Nachweis einer möglichen Komplementation erfolgt mit Hilfe von Salicin einem aromatischen β -Glykosid. Der *E. coli* Stamm K12 (DH5 α) kann Salicin nicht verwerten, weil das β -Glykosid-Operon (*bgl*-Operon), welches für Proteine kodiert, die die Verwertung von β -Glykosiden ermöglicht, durch das H-NS Protein reprimiert wird (Schnetz 1995; Caramel & Schnetz 1998). In der *hns*-Mutante wurde das *hns*-Gen durch Rekombination mit Hilfe des Flp-FRT-Systems aus dem Genom entfernt (Venkatesh et al. 2010). Somit wird das *bgl*-Operon in der *hns*-Mutante nicht länger

reprimiert, es wird exprimiert. Der Komplementationstest erfolgt über Selektion auf MacConkey-Agarplatten (Vollmedium mit pH-Indikator), denen Salicin zugesetzt ist. Kolonien der *hns*-Mutante, die Salicin verwerten können, besitzen eine rote Farbe, wohingegen Zellen des K12 Stammes (DH5 α), welche Salicin nicht verwerten können, weiß erscheinen. Die rote Färbung der Zellen kommt von einer pH-Änderung bei Verwertung des Salicins, wobei eine Säure entsteht. Bei einer erfolgreichen Komplementation erscheinen die Kolonien der *hns*-Mutante weiß, da das rekombinante Protein wie H-NS eine reprimierende Wirkung auf das *bgl*-Operon hat, so dass das Salicin nicht länger umgesetzt werden kann.

2.3.4 Amplifizierung von DNA-Fragmenten mittels Polymerase-Kettenreaktion

Die Amplifizierung von DNA-Fragmenten erfolgte mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Zur Klonierung von DNA-Fragmenten wurde die *Pfu* DNA Polymerase (2,5 U/ μ l) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) verwendet. Die PCR erfolgte mit dem PCR-Gerät Primus 96 Plus (MWG Biotech, Ebersberg). Für die *Pfu* DNA Polymerase wurde die *Annealing*-Temperatur der Oligonukleotide 5 °C unter deren Schmelztemperatur (T_m) gewählt (Tab. 2). Die Dauer der Elongation wurde abhängig von der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments gewählt (2 Minuten pro 1 kb). Die Zyklusanzahl wurde an die verwendeten Oligonukleotide angepasst. Wenn möglich, wurde ein Mastermix mit dem x-fachen Volumen einer PCR-Reaktion angefertigt. Für eine PCR-Reaktion wurde ein Ansatz von 20 μ l wie folgt pipettiert:

x μ l	1 ng Plasmid-DNA oder 50 ng gDNA
2 μ l	10 x Reaktionspuffer mit MgSO ₄
2 μ l	dNTPs (2 mM; dATP, dTTP, dGTP, dCTP)
0,5 μ l	Oligonukleotid <i>forward</i>
0,5 μ l	Oligonukleotid <i>reverse</i>
0,4 μ l	<i>Pfu</i> DNA Polymerase (2,5 U/ μ l)
ad 20 μ l	H ₂ O

Temperaturprofil für die *Pfu* PCR:

	Temperatur	Dauer	Zyklus
Erste Denaturierung	95 °C	5 Minuten	1
Denaturierung	95 °C	30 Sekunden	
<i>Annealing</i>	$T_m - 5$ °C	30 Sekunden	Optimale Zyklusanzahl
Elongation	72 °C	2 Minuten pro kb	
Finale Elongation	72 °C	5 Minuten	1

Tab. 2: Auflistung der verwendeten Oligonukleotide.

Restriktionsschnittstellen und Überhänge sind in Kleinbuchstaben dargestellt. * = Das Oligonukleotid wurde mit dem Oligonukleotid HvWHY1-pASK3_rev kombiniert, ¹ = Δ1–219 entspricht der Deletion der Aminosäuren 42–73 (Δ42–73), ² = del1–180 entspricht der Deletion der Aminosäuren 42–60 (Δ42–60).

Name	Sequenz (5´-3´)	Annealing-Temperatur	Gen
Oligonukleotide zur Klonierung von Überexpressionsvektoren			
HvWHY1-pASK3_for	atggtaggctctcaaatgATGTGCTCCGTCGTCC CCGC	55 °C	<i>HvWHIRLY1</i> (AK365452.1)
HvWHY1-pASK3_rev	atggtaggctctcagcgctCCTTCGCCACTCCAA TTCGGG	55 °C	
pASK-3_HvWHY2_for	atggtaggctctcaaatgATGGATGAGAATGCAT CTGCTAAG	55 °C	<i>HvWHIRLY2</i> (BF627441.2)
pASK-3_HvWHY2_rev	atggtaggctctcagcgctCCTGTCCCATTGAGA ATCTGGGT	55 °C	
ZmWHY1-pASK3_for	atggtaggctctcaaatgGCCTCCTCCCGTAAGG CCGC	55 °C	<i>ZmWHIRLY1</i> (Zm.88681)
ZmWHY1-pASK3_rev2	atggtaggctctcagcgctCCGACGCCATTCGTA CTCAGAC	55 °C	
AtWHY1-pASK-IBA3_for	atggtaggctctcaaatgATGGTGAAGCTCTTCT CGGT	55 °C	<i>AtWHIRLY1</i> (At1g14410)
AtWHY1-pASK-IBA3_rev	atggtaggctctcagcgctTCTATTCCATTCATAG TCTCCT	55 °C	
pASK-3_AtWHY2_for	atggtaggctctcaaatgATGGCAAGCTGGTCAA ATTCTTCA	55 °C	<i>AtWHIRLY2</i> (At1g71260.1)
pASK-3_AtWHY2_rev	atggtaggctctcagcgctTTTATCCCCTCCAGC TCTAACTG	55 °C	
AtWhy3-pASK-IBA3_for	atggtaggctctcaaatgATGTTGAAATTAACGG TGAAGT	55 °C	<i>AtWHIRLY3</i> (At2g02740)
AtWhy3-pASK-IBA3_rev	atggtaggctctcagcgctTCTACTCCATTCGTAG TCTC	55 °C	
HvWHY1Δ1–219_for* ¹	atggtaggctctcaaatgATGGAGAGGGAGCCG CCGGTGC	55 °C	N-terminal deletiertes <i>HvWHIRLY1</i>
HvWHY1-del1–180_for* ²	atggtaggctctcaaatgATGTCGCAGCGCGAC GC	55 °C	N-terminal deletiertes <i>HvWHIRLY1</i>
HvWhy1-BamHI_for	cgcgatccATGTGCTCCGTCGTCCC CGCG	58 °C	<i>HvWHIRLY1</i> (AK365452.1)
HvWhy1-PstI_rev	tttctgcagTCACCTTCGCCACTCCAATTC	58 °C	
Oligonukleotide für DNA Dot-Blot Sonden			
18SrDNA-gene_for	AGCTCGTAGTTGGACCTTGG	58 °C	<i>18S rDNA</i> (AY552749)
18SrDNA-gene_rev	TGGACCTGGTAAGTTTCCCC	58 °C	
HvpetD-intron_5for	ACAGGCTCCGTAAGATCCCA	58 °C	<i>petD</i> (NC_008590.1; 4525080)
HvpetD-intron_5rev	CGGCTCGAGCAAGAGTGAAA	58 °C	

2.3.5 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Quantifizierung von Nukleinsäuren erfolgte photometrisch bei Wellenlängen von 260 nm und 280 nm mit Hilfe eines NanoDrop 2000 Spektrophotometers (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Eine Extinktion von 1 entspricht dabei einer Konzentration von 50 µg/ml für doppelsträngige DNA bzw. einer Konzentration von 40 µg/ml bei RNA. Darüber hinaus wurde die Quantifizierung von genomischer DNA (gDNA) mit ethidiumbromidhaltigen Agarosegelen durchgeführt, wodurch gleichzeitig die Qualität der gDNA überprüft werden konnte. Als Standard, der die visuelle Abschätzung der Konzentration ermöglichte, dienten unterschiedliche Mengen einer Lambda-DNA (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Die visuelle Dokumentation und Abschätzung der DNA Konzentration erfolgte mit einer Kamera (Canon EOS 1100D) an einem UV-Tisch bei 312 nm (Multiimage™ Light Cabinet, Alpha Innotech Corporation, USA).

2.3.6 Auftrennung von Nukleinsäuren mittels Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Nukleinsäuren nach ihrer Größe erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese nach Sambrook et al. 1989. Je nach Größe der aufzutrennenden Nukleinsäuren wurde ein ethidiumbromidhaltiges Gel mit 0,75 % bis 2 % (w/v) Agarose verwendet. Die Agarosegele wurden mit 1 x TAE-Laufpuffer (2.3.1) überschichtet. Die Proben wurden mit 0,1-fachen Volumen des Auftragspuffers (10 x Bromphenolblau, 2.3.1) versehen, auf das Agarosegel aufgetragen und bei 80 V für 30–50 Minuten aufgetrennt. Die Dokumentation erfolgte mit einer Kamera (Canon EOS 1100D) an einem UV-Tisch bei 312 nm (Multiimage™ Light Cabinet, Alpha Innotech Corporation, USA).

Zur Größenbestimmung von Nukleinsäuren wurde die *GeneRuler 1 kb DNA Ladder* oder die *GeneRuler 100 bp DNA Ladder* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) verwendet.

Für die Aufreinigung von DNA-Fragmenten wurde das gewünschte DNA-Fragment unter UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit Hilfe des *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kits* (Macherey-Nagel, Düren) nach Angaben des Herstellers aus dem Gel eluiert.

2.3.7 Klonierung von DNA-Fragmenten

2.3.7.1 Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Das Schneiden von DNA erfolgte mit konventionellen bzw. *FastDigest* Enzymen (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). 1 µg PCR-Fragmente (2.3.4) oder 2 µg Plasmid-DNA wurden in einem 20 µl Ansatz mit 10–20 U Enzym eingesetzt und bei 37 °C nach Angaben des Herstellers inkubiert. Um eine Ligation des linearisierten Vektors mit sich selbst zu verhindern, wurde der Vektor nach der Restriktion mit der SAP (*shrimp alkaline phosphatase*, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) nach Angaben des Herstellers dephosphoryliert. Im Anschluss an die Restriktion bzw. die Dephosphorylierung erfolgte die Aufreinigung der DNA-Fragmente über ein Agarosegel (2.3.6).

2.3.7.2 Ligation

Für die Ligation von DNA-Fragmenten (2.3.7.1) in einen linearisierten Vektor (2.3.7.1 und 2.3.7.3) wurden der Vektor und das PCR-Fragment in einem Verhältnis von 1:3 eingesetzt. Die Ligation erfolgte in einem 20 µl Ansatz mit Hilfe des *Rapid DNA Ligation Kits* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) nach Angaben des Herstellers.

Gelegentlich wurden DNA-Fragmente nach PCR-Amplifizierung zur Zwischenklonierung in den Vektor pJET1.2 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) ligiert, dies erfolgte nach Angaben des Herstellers. Nach der Ligation wurde der Ansatz in *E. coli* DH5α transformiert (2.3.3.4).

2.3.7.3 Klonierung von Expressionsvektoren zur Überexpression von rekombinanten WHIRLY-Proteinen in *E. coli*

Zur Amplifizierung der zu klonierenden Sequenz wurde eine PCR mit der *Pfu* DNA Polymerase (2.3.4) unter Verwendung spezifischer Oligonukleotide (Kapitel 2.3.4, Tab. 2) durchgeführt. Zur anschließenden Klonierung der PCR-Fragmente in den Vektor pASK-IBA3 enthielten beide Oligonukleotide eine *Eco31I*-Schnittstelle am 5'-Ende (Abb. 5). Für die Klonierung in den Vektor pQE30 waren die Oligonukleotide am 5'-Ende mit einer *Bam*HI (*forward* Oligonukleotid) bzw. *Pst*I-Schnittstelle (*reverse* Oligonukleotid) versehen (Abb. 5 und Kapitel 2.3.4, Tab. 2). Die amplifizierten PCR-Produkte wurden auf einem Agarosegel aufgetrennt, das gewünschte PCR-Fragment wurde aus dem Agarosegel ausgeschnitten und aus dem Gel eluiert (2.3.6). Anschließend wurde das aufgereinigte PCR-Fragment mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen (2.3.7.1) geschnitten und mit Hilfe des

NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kits nach Angaben des Herstellers (Macherey-Nagel, Düren) aufgereinigt. Die Vektoren wurden ebenfalls mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen geschnitten (2.3.7.1), mittels SAP dephosphoryliert (2.3.7.1), über ein Agarosegel aufgereinigt (2.3.6) und aus dem Gel eluiert (2.3.7.1). Im Anschluss erfolgte die Ligation der aufgereinigten PCR-Fragmente mit dem entsprechenden Vektor (2.3.7.2). Alle für die heterologe Überexpression erstellten Konstrukte sind in Tab. 3 aufgelistet.

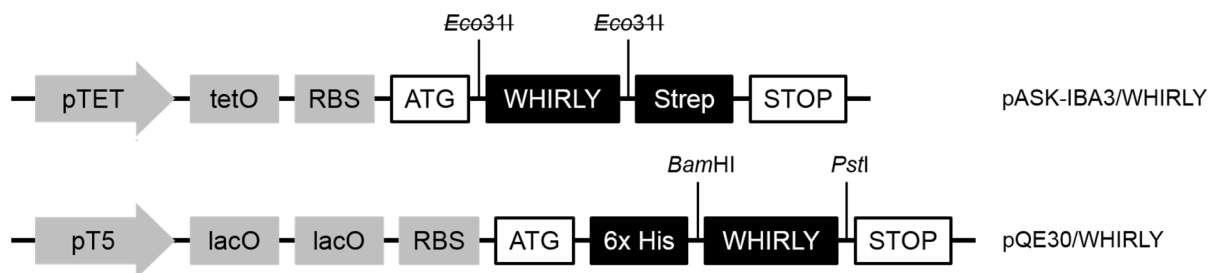


Abb. 5: Schematische Darstellung der Konstrukte zur Überexpression in *E. coli*.

pTET = Tetracyclin-induzierbarer Promotor, tetO = Tetracyclin Operator, RBS = ribosomale Bindestelle, ATG = Translationsstart, Strep = Strep-Tag, STOP = Translationsende, *Eco31I* = durch die Ligation einer Sequenz in den pASK-IBA3-Vektor mittels der *Eco31I*-Schnittstelle wird die Restriktionsschnittstelle zerstört, pT5 = T5-Promotor, lacO = *lac* Operator, 6x His = His-Tag.

Tab. 3: Klonierung von Konstrukten zur Überexpression in *E. coli*.

Name des Konstruktes	Zielvektor	Restriktion	Insert	Tag
pASK-IBA3/HvWHY1	pASK-IBA3	<i>Eco31I</i>	HvWHIRLY1 ohne Transitsequenz	Strep, C-terminal
pASK-IBA3/HvWHY2	pASK-IBA3	<i>Eco31I</i>	HvWHIRLY2 ohne Präsequenz	Strep, C-terminal
pASK-IBA3/ZmWHY1	pASK-IBA3	<i>Eco31I</i>	ZmWHIRLY1 ohne Transitsequenz	Strep, C-terminal
pASK-IBA3/AtWHY1	pASK-IBA3	<i>Eco31I</i>	AtWHIRLY1 ohne Transitsequenz	Strep, C-terminal
pASK-IBA3/AtWHY3	pASK-IBA3	<i>Eco31I</i>	AtWHIRLY3 ohne Transitsequenz	Strep, C-terminal
pASK-IBA3/AtWHY2	pASK-IBA3	<i>Eco31I</i>	AtWHIRLY2 ohne Präsequenz	Strep, C-terminal
pQE30/HvWHY1	pQE30	<i>BamHI/PstI</i>	HvWHIRLY1 ohne Transitsequenz	6x His, N-terminal

2.3.8 Ortsspezifische Mutagenese

Die ortsspezifische Mutagenese (auch *in vitro* Mutagenese) ermöglicht das gezielte Einbringen von Mutationen wie Substitutionen, Deletionen und Insertionen in

doppelsträngige Plasmid-DNA. Die gewünschte Mutation wird *in vitro* eingeführt, indem die Vektor-DNA einschließlich Zielgen mittels PCR amplifiziert wird. Für die Mutagenese-PCR werden zwei komplementäre Oligonukleotide verwendet, die beide die gewünschte Mutation tragen. Nach Amplifizierung des mutierten Plasmids erfolgt eine Behandlung mit der Endonuklease *DpnI*, welche die methylierte und hemimethylierte (nicht mutierte) Matrizen-Plasmid-DNA abbaut. Somit bleibt nur die neusynthetisierte, unmethylierte, *in vitro* mutierte Plasmid-DNA übrig. Diese wird im Anschluss mittels Hitzeschock in XL10-Gold *E. coli*-Zellen transformiert. Die noch offenen Enden der mutierten doppelsträngigen Plasmid-DNA werden in *E. coli* geschlossen.

Die ortsspezifische Mutagenese erfolgte mit Hilfe des *QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis* Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, United States). Die verwendeten Oligonukleotide (Tab. 4) wurden mit Hilfe des Programms *QuikChange Primer Design* erstellt. Die Mutagenese-Reaktion wurde wie folgt pipettiert:

100–200 ng	Plasmid-DNA
5 µl	10 x Reaktionspuffer
1 µl	dNTP Mix
125 ng	Oligonukleotid <i>forward</i>
125 ng	Oligonukleotid <i>reverse</i>
1,5 µl	<i>QuikSolution reagent</i>
ad 50 µl	H ₂ O
1 µl	<i>QuikChange Lightning Enzyme</i>

Temperaturprofil für die Mutagenese-Reaktion:

	Temperatur	Dauer	Zyklus
Erste Denaturierung	95 °C	2 Minuten	1
Denaturierung	95 °C	20 Sekunden	
<i>Annealing</i>	60 °C	10 Sekunden	18
Elongation	68 °C	2:15 Minuten	
Finale Elongation	68 °C	5 Minuten	1

Tab. 4: Auflistung der für die ortsspezifische Mutagenese von *WHIRLY1*-Sequenzen verwendeten Oligonukleotide.

Die Nummerierung der Aminosäuren bezieht sich auf die Position der Aminosäure im Vorstufenprotein. DBM = Nukleinsäure-Bindemotiv, PAD = vorhergesagte Autoregulationsdomäne, CBM = Kupferbindemotiv, * = del181-219_for/rev entspricht den Oligonukleotiden für HvWHY1Δ61-73; # = Δ56-60 wird zukünftig als HvWHY1ΔPRAPP bezeichnet.

Name	Sequenz (5'-3')
Oligonukleotide zum Einbringen von Substitutionen	
HvWHY1K97A-ivM-for	agctacagcatctacgccttcgaccccagg
HvWHY1K97A-ivM-rev	cctggggctgaaggcgtagatgctgtagct
ivMHvWHY1C165A_for	cttggtctaacagattcgggaggtcttcatgatc
ivMHvWHY1C165A_rev	gatcatgaaagaactcgcccgaatctgttagaccaag
P56/59/60A_for	acttcgacgcccggccgcgcgctcgag
P56/59/60A_rev	ctgacgacgcccggccgcgcgctgaagt
HvWHY1P56A_for	actacttcgacgcccgggccccg
HvWHY1P56A_rev	cggggcccggcgctgaagtagt
ivM_HvWHY1R57A_for	tacttcgaccccggccccgcccgc
ivM_HvWHY1R57A_rev	gacggcggggccgcccggcgctgaagta
ivM_ZmWHY1R63A_for	ctacttcgatccggcggtccgcccgc
ivM_ZmWHY1R63A_rev	cggcggcgagccgcccggatgaagtag
Oligonukleotide zum Einbringen von Deletionen	
HvWHY1ΔDBM-ivM_for	agcatctacaagggcggccgcccgcgctggccttc
HvWHY1ΔDBM-ivM_rev	gaaggccagcggcgggcgccctttagatgct
HvWHY1ΔPAD_for	gctggagcacgtttacaattctagcgttgagc
HvWHY1ΔPAD_rev	gctccaagcgtagaattgtaaacgtgctccagc
ivMHvWHY1ΔCBM_for	gtatcaacctcaattacatcatatttacaattctatcaagcccag
ivMHvWHY1ΔCBM_rev	ctcgggctgatagaattgtaaatgatgaattgaagggtgatac
del181-219_for*	gggccccgcccggagaggagcc
del181-219_rev*	ggctccctcggcgggggccc
ivM-HvWHY1Δ48-58_for	gcgacggcggcgcggggacg
ivM-HvWHY1Δ48-58_rev	cgtccccgcccggcgctgc
ivM-HvWHY1Δ48-60_for	gtcgcgctgcgacgcccggacgac
ivM-HvWHY1Δ48-60_rev	gtcgtccccgctgcgacgcccgc
Δ56-60_rev#	gcgtcgctgcgagtcgaagtagtcgg
Δ56-60_for#	ccgactacttcgactgcgacgcccgc

Nach der ortsspezifischen Mutagenese wurde die Mutagenese-Reaktion mit 2 µl *DpnI* vermischt und für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte mittels Hitzeschock die Transformation der Mutagenese-Reaktion in *E. coli* XL10-Gold. Dazu wurden 45 µl XL10-Gold-Zellen auf Eis aufgetaut, mit 2 µl β-Mercaptoethanol versetzt, vorsichtig gemischt und für weitere 2 Minuten auf Eis gehalten. Anschließend wurden 2 µl der Mutagenese-Reaktion

zu den XL10-Gold-Zellen pipettiert und vorsichtig gemischt. Die Zellen wurden für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte für 30 Sekunden bei 42 °C. Danach wurden die Zellen sofort für 2 Minuten auf Eis überführt und mit 500 µl auf 42 °C erwärmtes SOC-Medium versehen. Die Zellen wurden für 1 Stunde bei 37 °C und 180 UpM inkubiert. Danach wurden sie auf LB-Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C angezogen. Die Plasmid-DNA der erhaltenen Klone wurde mittels Sequenzierung (2.3.9) auf die Mutation hin überprüft.

2.3.9 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA erfolgte nach der Sanger-Methode am Institut für Klinische Molekularbiologie (IKMB) der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.

2.3.10 Isolierung genomischer DNA aus Gerste

Die Isolierung genomischer DNA (gDNA) aus Gerste erfolgte nach dem Protokoll von Fulton et al. (1995). In Stickstoff gemörserteres Blattmaterial wurde bis zur 0,5 ml Marke in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Probe wurde mit 750 µl *Microprep*-Puffer versehen und mit Hilfe eines Vortexmischers (MS2 Minishaker, IKA Labortechnik, Staufen) gründlich gemischt. Anschließend wurde die Probe für 45 Minuten bei 65 °C schüttelnd (950 UpM) inkubiert. Nachdem die Probe auf Raumtemperatur abgekühlt war, wurde sie mit 750 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) versetzt und durch Invertieren gemischt. Es folgte eine Zentrifugation für 5 Minuten bei 10.000 UpM und Raumtemperatur (Centrifuge 5415 D, Eppendorf, Hamburg). Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und zur Fällung der DNA mit dem 0,7-fachen Volumen Isopropanol (kalt) versehen. Die Probe wurde vorsichtig invertiert und für 5 Minuten bei 10.000 UpM und Raumtemperatur zentrifugiert. Die dabei pelletierte DNA wurde zweimal mit kaltem 70 % Ethanol (v/v) gewaschen, getrocknet und in 50 µl 5 mM Tris pH 8,5 und 4 µg RNase A (Roth, Karlsruhe) über Nacht bei 4 °C gelöst.

DNA-Extraktionspuffer:	350 mM	Sorbitol
	100 mM	Tris/HCl pH 7,5
	5 mM	EDTA

<i>Nuclei-Lysis-Puffer:</i>	200 mM	Tris/HCl pH 7,5
	5 mM	EDTA
	2 M	NaCl
	2 % (w/v)	CTAB
<i>Microprep-Puffer:</i>	2,5 ml	DNA-Extraktionspuffer
	2,5 ml	<i>Nuclei-Lysis-Puffer</i>
	0,5 ml	10 % (w/v) <i>N</i> -Lauroylsarcosin
	Spatelspitze	Natriumbisulfit

2.3.11 Relative Quantifizierung der plastidären DNA

Die Quantifizierung der ptDNA erfolgte mit Hilfe eines DNA Dot-Blots (2.3.11.1) und mittels einer quantitativen PCR (2.3.11.2).

2.3.11.1 DNA Dot-Blot

Für die relative Quantifizierung der ptDNA mittels DNA Dot-Blot wurde das *DIG-High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II* (Roche Diagnostics, Mannheim) verwendet. Zum Nachweis des nukleären Gens *18S rDNA* bzw. des plastidären Gens *petD* wurde zunächst eine Sonde nach Angaben des Herstellers hergestellt. Dazu wurde die Sondensequenz mittels *Pfu* PCR aus gDNA mit genspezifischen Oligonukleotiden (Kapitel 2.3.4, Tab. 2) amplifiziert (2.3.4) und in den Vektor pJet1.2 kloniert (2.3.7). Die inserierten Sequenzen wurden mittels Sequenzierung (2.3.9) überprüft und anschließend für eine *Pfu* PCR zur Amplifizierung der Sonden-Sequenz als Matrize eingesetzt (2.3.4). Die so amplifizierte Sonden-Sequenz wurde auf einem Agarosegel aufgetrennt, aus dem Agarosegel aufgereinigt (2.3.6) und anschließend in einer Reaktion zur Markierung der Sonden-Sequenz mittels Digoxigenin (DIG) nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Nachdem die Effizienz der DNA-Markierung mittels DIG nach Herstellerangaben überprüft wurde, konnten die Sonden zum Nachweis plastidärer bzw. nukleärer DNA eingesetzt werden.

Die isolierte gDNA (2.3.10) wurde mittels Agarosegel (2.3.6) auf 100 ng/µl eingestellt. Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe erstellt (Tab. 5). Von jeder Verdünnungsstufe (Tab. 5) wurden 15 µl abgenommen, mit 85 µl TE-Puffer (2.3.1) und 100 µl 0,8 M NaOH/20 mM EDTA pH 8,0 versetzt. Die so verdünnte gDNA wurde 10 Minuten im Wasserbad bei 100 °C denaturiert und danach auf Eis abgekühlt. Die Proben wurden kurz zentrifugiert und konnten anschließend mittels DNA Dot-Blot auf einer Membran immobilisiert werden.

Tab. 5: Verdünnungsreihe der gDNA für den DNA Dot-Blot.

Verdünnungsstufe	Volumen gDNA	SSC	Verdünnungsfaktor	gDNA in 15 µl
Stufe 1	35 µl (100 ng/µl)	35 µl 4 x SSC	1	750 ng
Stufe 2	35 µl Stufe 1	35 µl 2 x SSC	2	375 ng
Stufe 3	35 µl Stufe 2	35 µl 2 x SSC	4	187,5 ng
Stufe 4	35 µl Stufe 3	35 µl 2 x SSC	8	93,75 ng

Für den DNA Dot-Blot wurde eine positiv geladene Nylonmembran (Hybond N+, GE Healthcare, Freiburg) und eine Lage Whatman Filterpapier (Rotilabo®-Blottingpapiere, Dicke 0,35 mm, Roth, Karlsruhe) auf die Größe der Blot-Apparatur (SRC 96D Minifold I, Schleicher & Schuell, Dassel, Germany) zugeschnitten. Die Nylonmembran und das Whatman Filterpapier wurden in sterilem deionisiertem Wasser befeuchtet. Zuerst wurde das Whatman Filterpapier, dann die Nylonmembran auf die Blot-Apparatur gelegt. Danach wurde der Deckel auf der Apparatur fixiert und mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe ein Vakuum angelegt. Die Probenkammern wurden mit je 400 µl sterilem deionisiertem Wasser gespült, anschließend wurden die Proben aufgetragen. Nachdem alle Proben durch die Membran gesogen worden waren, wurden die Probenkammern mit 400 µl 0,4 M NaOH nachgespült. Die Membran wurde an der Luft getrocknet und mittels UV-Licht auf der Membran fixiert (Stratalinker® UV Crosslinker 2400, Stratagene, CA, USA). Die Hybridisierung mit den DIG-markierten DNA-Sonden erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die Hybridisierung der *18S rDNA*- bzw. *petD*-Sonde erfolgte bei 46 °C bzw. 42 °C über Nacht. Die Detektion wurde mit dem Antikörper α -Digoxigenin-AP (α -DIG-AP) und der Detektionslösung *CSPD ready-to-use* nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.3.11.2 Quantitative PCR (qPCR)

Eine weitere Methode zur relativen Quantifizierung der ptDNA stellt die quantitative PCR (qPCR) dar. Zum Nachweis der Kern-DNA bzw. ptDNA wurden spezifische Oligonukleotide für die nukleären Gene *18S rDNA* und *RBCS* sowie die plastidären Gene *petD* und *psbA* verwendet (Tab. 6). Die qPCR wurde mit dem *QuantiFast SYBR Green PCR Kit* (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers unter Verwendung der hergestellten gDNA (2.3.10) durchgeführt. Pro Reaktion wurden 0,1 ng gDNA eingesetzt. Die PCR-Reaktion erfolgte nach dem Zwei-Schritt-Protokoll in dem Gerät *Rotor-Gene® Q* (Qiagen, Hilden) unter folgenden Bedingungen:

	Temperatur	Dauer	Zyklus
Erste Denaturierung	95 °C	10 Minuten	1
Denaturierung	95 °C	15 Sekunden	40 Zyklen
<i>Annealing</i> & Elongation	58 °C	30 Sekunden	

Nach der PCR wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, um die Spezifität der Oligonukleotide während der Reaktion zu überprüfen. Dazu wurde die Temperatur schrittweise von 50 °C auf 99 °C erhöht (1 °C pro Sekunde). Für jede Reaktion wurden drei technische Replikate erstellt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der *Rotor-Gene Q Software* (Version 2.0.2.4) (Qiagen, Hilden). Die relative Quantifizierung der ptDNA erfolgte in Bezug zum *18S rDNA*-Gen und wurde nach der $\Delta\Delta C_T$ -Methode durchgeführt (Livak & Schmittgen 2001).

Tab. 6: Sequenzen der Oligonukleotide, die für die Bestimmung der DNA-Menge mittels quantitativer PCR eingesetzt wurden.

Name	Sequenz (5'-3')	Gen
HvRBCS for qRT	CTACCACCGTCGCACCCTTCC	<i>RBCS</i> (AB020943.1)
HvRBCS rev qRT	TGATCCTTCCGCCATTGCTGAC	
Hv18S for qRT	CAGGTCCAGACATAGCAAGGATTGACAG	<i>18S rDNA</i> (AY552749)
Hv18S rev qRT	TAAGAAGCTAGCTGCGGAGGGATGG	
HvpsbA qRT for	CAGAAAAGCTTCCTTGACCA	<i>PsbA</i> (X07942)
HvpsbA qRT rev	CAATGGTGGTCCTTATGAGC	
HvpetD qRT for	GGGCGTTCTCTTAATGGTTT	<i>petD</i> (NC_008590.1; 4525080)
HvpetD qRT rev	AATGGGTAGTGTGCTCCAA	

2.3.12 Isolierung von Gesamt-RNA aus Gerste

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Gerste erfolgte mit dem peqGOLD TriFAST™-Reagenz (VWR, Erlangen) nach Angaben des Herstellers. Etwa 100 mg Blattmaterial wurden in flüssigem Stickstoff fein gemörsert, mit 700 µl peqGOLD TriFAST™-Reagenz versehen und mit Hilfe eines Vortexmischers (MS2 Minishaker, IKA Labortechnik, Staufen) gründlich gemischt. Die Probe wurde für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, danach mit 200 µl Chloroform versehen und für 15 Sekunden gründlich gemischt (Vortexmischer). Anschließend wurde die Probe für 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und für 15 Minuten bei 14.000 UpM zur Phasentrennung zentrifugiert (Centrifuge 5415 D, Eppendorf, Hamburg). Die oberste wässrige, RNA-enhaltende Phase wurde vorsichtig abpipettiert und in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Fällung der RNA erfolgte,

indem die Probe mit 500 μl (v/v) Isopropanol versehen, für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und für weitere 10 Minuten bei 14.000 UpM und 4 °C zentrifugiert wurde. Anschließend wurde die RNA durch Zugabe von 1 ml kaltem 70 %igen Ethanol und einer Zentrifugation für 5 Minuten bei 14.000 UpM und 4 °C gewaschen. Das RNA-Pellet wurde kurz an der Luft getrocknet und dann in 50 μl deionisiertem Wasser resuspendiert. Bis zur weiteren Verwendung wurde die RNA bei -80 °C gelagert.

2.3.13 Synthese von cDNA

Von der isolierten Gesamt-RNA (2.3.12) wurde 1 μg als Vorlage für die cDNA-Synthese mit dem Kit *QuantiTect® Reverse Transcription* (Quiagen, Hilden) eingesetzt. Die cDNA-Synthese erfolgte nach Angaben des Herstellers. Nach der Synthese wurde die cDNA 1:3 mit sterilem deionisiertem Wasser verdünnt.

2.3.14 Quantitative *Real-Time* PCR (pRT-PCR)

Zur Untersuchung der Transkriptmenge wurde eine quantitative *Real-Time* PCR (qRT-PCR) mit genspezifischen Oligonukleotiden durchgeführt. Die in dieser Arbeit für die qRT-PCR verwendeten Oligonukleotide sind in Tab. 7 aufgeführt. Die Oligonukleotide wurden mit Hilfe des Programms *Primer 3* erstellt. Die pRT-PCR wurde mit dem *QuantiFast SYBR Green PCR* Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers unter Verwendung der hergestellten cDNA (2.3.13) durchgeführt. Die PCR-Reaktion erfolgte nach dem Zwei-Schritt-Protokoll in dem Gerät *Rotor-Gene® Q* (Qiagen, Hilden) unter folgenden Bedingungen:

	Temperatur	Dauer	Zyklus
Erste Denaturierung	95 °C	5 Minuten	1
Denaturierung	95 °C	10 Sekunden	40 Zyklen
<i>Annealing</i> & Elongation	58 °C	30 Sekunden	

Nach der PCR wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, um die Spezifität der Oligonukleotide während der Reaktion zu überprüfen. Dazu wurde die Temperatur schrittweise von 50 °C auf 99 °C erhöht (1 °C pro Sekunde). Für jede Reaktion wurden drei technische Replikate erstellt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der *Rotor-Gene Q Software* (Version 2.0.2.4) (Qiagen, Hilden). Die relative Quantifizierung der Transkriptmengen wurde nach der $\Delta\Delta C_T$ -Methode durchgeführt (Livak & Schmittgen 2001).

Tab. 7: Sequenzen der Oligonukleotide, die für die quantitative *Real-Time* PCR verwendet wurden.

Name	Sequenz (5'-3')	Gen
Hv18S for qRT	CAGGTCCAGACATAGCAAGGATTGACAG	18S rRNA (AY552749)
Hv18S rev qRT	TAAGAAGCTAGCTGCGGAGGGATGG	
HvWhy1 for qRT	GATGGGAATGGTCGCTTTTT	HvWHIRLY1 (AK365452.1)
HvWhy1 rev qRT	CCATGATGTGCGGTATGATG	
HvPol1 qRT for2	TCCACCATCCAGTACATCCA	HvPolI-like DNA Polymerase (KM236205)
HvPol1 qRT rev2	CAGTTGGCCATGGAGATGTC	

2.3.15 Färbung von Nukleoiden mittels YO-PRO®-1

Zur Visualisierung von plastidären Nukleoiden wurden dünne Querschnitte von Gerstenprimärblättern verwendet. Die Blattquerschnitte wurden mit Hilfe eines Handmikrotoms angefertigt und zur Fixierung in eine 4 %ige Formaldehyd-Lösung in 1 x PBS (2.3.1) auf Eis überführt. Zur Infiltration des Gewebes erfolgte eine Inkubation für 15 Minuten in einer SpeedVac bei 600 Pa (Heto, Holten, Allerød, Dänemark). Anschließend wurden die Querschnitte über Nacht bei 4 °C gelagert. Die Querschnitte wurden dreimal mit 2 x SSC (2.3.1) gewaschen und danach mit 10–50 µg/ml RNase A (Roth, Karlsruhe) in 2 x SSC für 60 Minuten bei 37 °C behandelt. Nach dreimaligem Waschen in 2 x SSC wurden die Querschnitte mit YO-PRO®-1 Iodid (491/509) (YO-PRO®-1) (Molecular Probes, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) gefärbt. Dazu wurde YO-PRO®-1 in einer Verdünnung von 1:2000 in 2 x SSC eingesetzt. Die Querschnitte wurden abgedunkelt für 60 Minuten bei Raumtemperatur in der YO-PRO®-1-Lösung inkubiert und im Anschluss dreimal mit 2 x SSC gewaschen. Schließlich wurden die Querschnitte auf einem Objektträger in 1 x SSC und 50 % Glycerin eingebettet und über Nacht bei 4 °C gelagert.

2.3.16 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM)

Die Morphologie plastidärer Nukleoide wurde mit dem Konfokalmikroskop (CLSM, *confocal laser scanning microscope*) Leica TCS SP5 (Leica Microsystems, Wetzlar) untersucht. Dazu wurden fixierte Blattquerschnitten verwendet (siehe 2.3.15). Für alle Aufnahmen wurde das Objektiv HCX PL Apo CS 63.0 x 1.2 Water verwendet. Die Aufnahme und Auswertung der Bilder erfolgte mit der LAS AF Lite Software (Leica Microsystems, Wetzlar). Die Lochblende (*pinhole*) wurde für die Aufnahmen auf 111,5 µm geöffnet. Der Laser und der Detektor (Photomultiplier, PMT) wurden wie folgt eingestellt:

YO-PRO®-1: Anregung: Argonlaser (30 %) mit 488 nm (15 %), Emission: 500–556 nm

Chlorophyll: Anregung: HeNe Laser mit 633 nm (12 %), Emission: 657–747 nm

2.4 Methoden zur Analyse von Proteinen

2.4.1 Herstellung von Bakterienlysaten

Bakterienzellen, die aus 1 ml Bakteriensuspension durch Zentrifugation pelletiert wurden (2.3.3.7), wurden entsprechend ihrer optischen Dichte in 1 x PSB (siehe 2.4.8) resuspendiert. Bei einer optischen Dichte OD_{600} von 0,7 erfolgte die Resuspension in 50 μ l 1 x PSB. Die Zellen wurden danach für 10 Minuten bei 95 °C aufgeköcht, auf Eis abgekühlt und anzentrifugiert. Anschließend wurden 10–20 μ l des so vorbereiteten Bakterienlysats auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (2.4.8).

2.4.2 Zellaufschluss unter nativen Bedingungen

Zum Zellaufschluss unter nativen Bedingungen wurden die pelletierten Bakterienzellen (siehe 2.3.3.7) in 1 x PBS-Puffer (pro 1 g Pellet wurden 10 ml 1 x PBS-Puffer hinzugegeben) (siehe 2.3.1) resuspendiert und mittels Ultraschall (Sonicator, Bandelin SONOPULS) für 5 x 20 Sekunden, 5 x 30 Sekunden und 10 x 20 Sekunden bei 70 % aufgebrochen. Das Bakterienlysate wurde für 25 Minuten bei 10.000 x g und 4 °C zentrifugiert (Centrifuge 5804 R, Eppendorf, Hamburg). Dieser Zentrifugationsschritt trennt die löslichen Proteine im Überstand von Zelltrümmern und unlöslichen Bestandteilen im Pellet. Anschließend erfolgte eine Behandlung des Überstandes mit 100 μ g RNase A (Roth, Karlsruhe) und 10 μ l DNase I (1 U/ μ l) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) für 15 Minuten auf Eis und eine Zentrifugation bei 10.000 x g und 4 °C für 25 Minuten. Das so erhaltene Rohextrakt wurde für die Aufreinigung mittels Nickel-NTA verwendet (siehe 2.4.3).

2.4.3 Native Proteinaufreinigung mittels Affinitätschromatographie an Nickel-NTA

Die native Proteinaufreinigung von rekombinanten Proteinen, die mit einem His-Tag markiert waren, erfolgte mit Hilfe einer Affinitätschromatographie an einer Nickel-NTA-Matrix (Ni-NTA). Die Aufreinigung basiert auf einer Wechselwirkung der Imidazolgruppe der Histidine mit den zweiwertigen Nickel-Ionen (Ni^{2+}), die an der Matrix immobilisiert sind. Durch Zugabe von Imidazol erfolgt die Elution der gebundenen Proteine, da Imidazol mit den Proteinen um die Bindung an die Nickel-Ionen konkurriert.

Für die native Proteinaufreinigung wurde Ni-NTA Agarose nach Angaben des Herstellers verwendet (Quiagen, Hilden). Das Rohextrakt (2.4.2) wurde für 60 Minuten mit der Ni-NTA Agarose bei gelegentlichem Schwenken auf Eis inkubiert, was die Bindung des His-Tags an die Nickel-Ionen ermöglichte. Nach der Bindung erfolgten drei Waschschriffe mit 4 ml

Waschpuffer. Mit 3 ml Elutionspuffer wurden die Proteine eluiert. Das Eluat wurde in Fraktionen á 300 µl aufgefangen. Zur Identifizierung der Protein-enthaltenden Fraktionen wurde die Proteinkonzentration der einzelnen Fraktionen photometrisch bei einer Wellenlänge von 280 nm mit einem NanoDrop 2000 Spektrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) gemessen. Bei hoher Proteinkonzentration der letzten Fraktion, erfolgte eine zweite Elution mit 3 ml Elutionspuffer. Die Protein-enthaltenden Fraktionen wurden vereint.

Zum Entfernen des Imidazols wurde im Anschluss an die Affinitätschromatographie eine Gelfiltration durchgeführt. Die Gelfiltrationssäule (PD-10 Column, Sephadex™ G-25M, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) wurde 6 x mit 4,5 ml 1 x PBS-Puffer (siehe 2.3.1) gewaschen. Dann wurden 2,5 ml Eluat auf die Säule gegeben. Der Durchlauf wurde verworfen. Die Proteine wurden mit 3,5 ml 1 x PBS-Puffer von der Gelfiltrationssäule eluiert. Zum Ankonzentrieren des Eluats wurden Vivaspin 6 Säulen mit einer Ausschlussgröße von 3 kDa (Sartorius Stedium, Biotech GmbH, Göttingen) verwendet. Das Eluat wurde durch Zentrifugation bei 10.000 x g und 4 °C auf ein Volumen von 1 ml reduziert (Centrifuge 5804 R, Eppendorf, Hamburg). Die aufgereinigten rekombinanten Proteine wurden bei -20 °C gelagert.

Waschpuffer:	10 mM	Imidazol
	in 1 x PBS-Puffer	
Elutionspuffer:	500 mM	Imidazol
	in 1 x PBS-Puffer	

2.4.4 Isolierung von Gesamtprotein aus Pflanzenmaterial

Die Extraktion von Gesamtprotein erfolgte nach einem leicht veränderten Protokoll von Dehesh et al. (1986). Für die Extraktion wurde das Pflanzenmaterial in flüssigem Stickstoff gemörsert, bis zur 0,5 ml Marke in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 500 µl Extraktionspuffer versehen. Die Probe wurde kräftig gemischt und für 5 Minuten bei 95 °C schüttelnd (700 UpM) inkubiert. Anschließend wurde das Proteinextrakt für 5 bis 10 Minuten auf Raumtemperatur abgekühlt und für 20 Minuten bei 13.200 UpM zentrifugiert (Centrifuge 5415 D, Eppendorf, Hamburg). Der Protein-enthaltende Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -20 °C gelagert.

Extraktionspuffer:	62,5 mM	Tris/HCl pH 6.8
	10 % (v/v)	Glycerin
	1 % (w/v)	SDS
	5 %	β -Mercaptoethanol

2.4.5 Isolierung von plastidären Nukleoiden aus Gerste

Für die Isolierung der Nukleotide wurden zunächst Chloroplasten mit kleinen Änderungen nach Majeran et al. (2012) aufgearbeitet. Alle Arbeiten erfolgten im Grünlicht auf Eis im Kühlraum. Die verwendeten Puffer wurden gekühlt verwendet.

Die Chloroplasten wurden aus 100 g Gerstenprimärblättern isoliert. Die Blätter wurden in 5 mm große Stücke geschnitten und in GM-Puffer in einem *Waring Blendor* zerkleinert (4 x 2–3 Sekunden auf höchster Stufe und 3 Sekunden auf niedrigster Stufe). Das Homogenat wurde durch vier Lagen Miracloth (Millipore, Billerica, MA USA) filtriert. Die Blattstücke wurden vom Miracloth abgenommen und erneut im *Waring Blendor* zerkleinert. Der Homogenisierungsschritt wurde 1–3 x wiederholt. Anschließend wurde das Filtrat bei 6000 UpM und 4 °C für 1 Minute zentrifugiert (Avanti J-26 XP, Beckman Coulter, Brea, CA, USA; Rotor JA-14). Die Überstände wurden aufgefangen und der Zentrifugationsschritt wurde mit den Überständen 2–3 x wiederholt. Die Pellets wurden in einem kleinen Volumen GM-Puffer resuspendiert und mit GM-Puffer auf 36 ml (für sechs Gradienten) aufgefüllt. 6 ml Probe wurden auf einen PF Percoll-Stufengradienten aufgetragen. Anschließend wurden die Gradienten im Ausschwingrotor ohne Bremse und Beschleunigung bei 4500 x g und 4 °C für 20 Minuten zentrifugiert (Centrifuge 5804 R, Eppendorf, Hamburg). Die intakten Chloroplasten befanden sich zwischen der 80 %igen und 35 %igen Gradientenlösung und wurden mit einer Pipette abgenommen. Die Chloroplasten wurden mit dem 5-fachen Volumen GM-Puffer gewaschen und für 10 Minuten bei 2000 x g und 4 °C zentrifugiert (Avanti J-26 XP, Beckman Coulter, Brea, CA, USA; Rotor JA-25-50). Der Überstand wurde aufgefangen und der Zentrifugationsschritt wiederholt. Die pelletierten Chloroplasten wurden in einem kleinen Volumen GM-Puffer aufgenommen.

GM-Puffer:	330 mM	Sorbitol
	50 mM	HEPES/KOH pH 8,0
	2 mM	EDTA
	8 mM	Ascorbinsäure
	5 mM	L-Cystein

PF Percollösungen:	80 % bzw. 35 % (v/v) Percoll	
	330 mM	Sorbitol
	50 mM	HEPES/KOH pH 8,0
	2 mM	EDTA
	0,98 % (w/v)	Ficoll PM 400
	2,9 % (w/v)	PEG (MW 4000)

Im Anschluss erfolgte die Isolierung der Nukleoide aus den aufgearbeiteten Chloroplasten nach Jeong et al. (2003).

Die Chloroplasten wurden in 30 ml NI-Puffer resuspendiert. Zur Lyse der Chloroplasten wurde unter Rühren schrittweise Nonidet P-40 bis zu einer Endkonzentration von 2 % hinzugegeben und die Suspension für 30 Minuten bei 4 °C rührend inkubiert. Danach wurde die Suspension für 10 Minuten bei 3000 x g und 4 °C zentrifugiert (Avanti J-26 XP, Beckman Coulter, Brea, CA, USA; Rotor JA-25-50). Der Überstand (Ü1) und das Pellet (= Nukleoidpellet 1) wurden weiter verwendet. Zum einen wurde das erhaltene Nukleoidpellet 1 in 30 ml NI-Puffer resuspendiert und bei 48.000 x g für 40 Minuten zentrifugiert. Der aus diesem Schritt erhaltene Überstand (Ü1a) wurde bei -80 °C eingefroren. Das Nukleoidpellet 1 wurde im restlichen Puffer aufgenommen, mit dem 0,33-fachen Volumen Glycerin versetzt und bei -80 °C gelagert. Zum anderen wurde der erste Überstand (Ü1) bei 48.000 x g und 4 °C für 40 Minuten zentrifugiert. Der dabei entstehende Überstand (Ü2) wurde in einem 50 ml Sarstedtgefäß aufgefangen und bei -80 °C gelagert. Das Nukleoidpellet 2 wurde in 30 ml NI-Puffer + 2 % Nonidet resuspendiert und erneut bei 48.000 x g und 4 °C für 40 Minuten zentrifugiert. Der Überstand (Ü3) wurde in einem 50 ml Sarstedtgefäß aufgefangen und bei -80 °C gelagert. Das Nukleoidpellet 2 wurde in 200 µl NI-Puffer mit 2 % Nonidet resuspendiert und für die Lagerung bei -80 °C mit dem 0,33-fachen Volumen Glycerin versetzt.

NI-Puffer:	17 % (w/v)	Saccharose
	20 mM	Tris/HCl pH 7,6
	0,5 mM	EDTA
	1,2 mM	Spermidin
	7 mM	β-Mercaptoethanol
	1 mM	PMSF

2.4.6 Proteinfällung

Enthielten die Proben für die weitere Verwendung eine zu geringe Proteinkonzentration erfolgte eine Proteinfällung mit Trichloressigsäure (TCA). Dazu wurden die Probe zu gleichen Teilen mit 20 % TCA vermischt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach der Fällung erfolgte eine Zentrifugation für 30 Minuten bei 11.000 UpM und 4 °C (Centrifuge 5804 R, Eppendorf, Hamburg). Das Proteinpellet wurde mit 300 µl kaltem Aceton gewaschen und nochmals für 30 Minuten bei 11.000 UpM und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet getrocknet, in deionisiertem Wasser aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.4.7 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgt nach Bradford (1976) mit dem *Bio-Rad Assay* (Bio-Rad Laboratories, München). 1–2 µl des Proteinextrakts wurden dazu mit deionisiertem Wasser auf 800 µl aufgefüllt und mit 200 µl Farbreagenz versehen. Das Gemisch wurde mindestens 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Absorption mit einem Spektralphotometer (Spektralphotometer UV-2501 PC, Shimadzu, China) bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen. Als Referenz diente eine Eichreihe mit Rinderserumalbumin (BSA, Roth, Karlsruhe).

2.4.8 Auftrennung von Proteinen mittels denaturierender SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur denaturierenden Auftrennung von Proteinen wurde eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970) durchgeführt. Zur Auftrennung von rekombinanten Proteinen aus *E. coli* wurde ein 14 %iges (w/v) Trenngel verwendet. Die Zusammensetzung des Gels ist in Tab. 8 dargestellt. Die Auftrennung von Proteinproben aus der Gerste erfolgte mit 14 %igen High-Tris Trenngelen, die entsprechend den Angaben in Tab. 9 erstellt wurden. Bei der Verwendung eines SDS-Polyacrylamid-Gels (SDS-PA-Gel) wurden die Proteinproben mit 1 x PSB versetzt und für 10 Minuten bei 95 °C denaturiert. Anschließend wurden die Proben auf Eis abgekühlt, anzentrifugiert und auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 20–30 mA in 1 x Puffer nach Laemmli (1970). Erfolgte die Auftrennung der Proteinproben auf einem High-Tris SDS-PA-Gel wurden die Proben mit 1 x High-Tris Puffer versetzt und, wie zuvor beschrieben, denaturiert. Die Auftrennung erfolgte über Nacht bei 4 mA und 4 °C in 1 x High-Tris Laufpuffer.

Zur Molekulargewichtsbestimmung wurde die *PageRuler™ Prestained Protein Ladder* 10–180 kDa (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) oder der *Unstained Protein Marker, Broad Range 2–212 kDa* (New England Biolabs, Frankfurt am Main) verwendet.

Tab. 8: Zusammensetzung eines SDS-PA-Gels.

Stammlösung	15 ml 14 %iges Trenngel	5 ml 4,5 %iges Sammelgel
Acrylamid/Bisacrylamid 30 %	7 ml	0,75 ml
1 M Tris/HCl pH 8,8	5,7 ml	-
1 M Tris/HCl pH 6,8	-	1,3 ml
20 % SDS	75 µl	25 µl
10 % APS	75 µl	50 µl
TEMED	8 µl	8 µl
H ₂ O	2,2 ml	3 ml

Tab. 9: Zusammensetzung eines High-Tris SDS-PA-Gels.

Stammlösung	15 ml 14 %iges High-Tris Trenngel	5 ml 4,2 %iges Sammelgel
Acrylamid/Bisacrylamid 30 %	6,9 ml	1,1 ml
3 M Tris/HCl pH 8,8	3,75 ml	-
1 M Tris/HCl pH 6,8	-	2 ml
20 % SDS	75 µl	38 µl
10 % APS	75 µl	75 µl
TEMED	8 µl	12 µl
H ₂ O	4,26 ml	4,6 ml

1 x PSB:	50 mM	Tris/HCl pH 6,8
	50 mM	DTT
	10 % (v/v)	Glycerin
	2 % (w/v)	SDS
	0,1 % (w/v)	Bromphenolblau
10 x Puffer nach Laemmli:	250 mM	Tris/HCl pH 6,8
	1,9 M	Glycin
	1 % (w/v)	SDS

3,5 x High-Tris Puffer:	160 mM	Tris/HCl pH 6,8
	5,5 % (w/v)	SDS
	30 % (v/v)	Glycerin
	0,5 % (w/v)	Bromphenolblau
	19 % (v/v)	β -Mercaptoethanol
	3 M	Harnstoff
10 x High-Tris Laufpuffer:	60,6 g/l	Tris/HCl pH 6,8
	142,8 g/l	Glycin
	1 % (w/v)	SDS
	pH 8,5 mit HCl einstellen	

2.4.9 Färbung von Proteinen in SDS-Polyacrylamid-Gelen

Für die Färbung von Proteinen in SDS-PA-Gelen wurde der Farbstoff Coomassie-Brilliantblau R250 verwendet. Die SDS-PA-Gele wurden über Nacht in der Färbelösung inkubiert und anschließend in Entfärbelösung entfärbt bis die Proteinbanden sichtbar wurden. Danach wurden die Gele für mindestens einen Tag in deionisiertem Wasser gelagert.

Coomassie-Färbelösung:	25 % (v/v)	Isopropanol
	10 % (v/v)	Essigsäure
	0,1 % (w/v)	Coomassie-Brilliantblau R250
Entfärbelösung:	25 % (v/v)	Isopropanol
	10 % (v/v)	Essigsäure

2.4.10 Western Blot Transfer

Die gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden mittels Western Blot auf eine Nitrocellulose-Membran (Roti®-NC, Porengröße 0,2 μ m, Roth, Karlsruhe) transferiert. Die Nitrocellulose-Membran wurde kurz in deionisiertem Wasser angefeuchtet und anschließend wie das SDS-PA-Gel für 5 Minuten in Transferpuffer äquilibriert. Vor dem Aufbau des Blots wurden zudem sechs Lagen Whatman Filterpapier (Rotilabo®-Blottingpapiere, Dicke 0,35 mm, Roth, Karlsruhe) in Transferpuffer angefeuchtet. Der Western Blot wurde wie folgt aufgebaut. Als erstes wurden drei Lagen Whatman Filterpapier auf die Anode der Blottingapparatur (Fastblot B44; Biometra, Göttingen) gelegt. Darauf wurde die

Nitrocellulose-Membran und darüber das SDS-PA-Gel und erneut drei Lagen Whatman Filterpapier platziert. Als letztes wurde die Kathode aufgesetzt. Der Transfer erfolgt bei 2 mA pro cm² Gel für 35 Minuten im Kühlraum.

Transferpuffer:	2,93 g/l	Glycin
	5,81 g/l	Tris
	20 % (w/v)	SDS
	200 ml/l	Methanol

2.4.11 Färbung von Proteinen auf Nitrozellulose-Membranen

Mit Hilfe des Farbstoffs Ponceau S können die auf eine Nitrozellulose-Membran immobilisierten Proteine reversibel angefärbt werden und ein gleichmäßiger Transfer der Proteine vor der Immundetektion überprüft werden.

Zur Färbung der Proteine wurde die Membran 5 bis 10 Minuten in der Ponceau-Färbelösung schwenkend inkubiert und anschließend mit deionisiertem Wasser solange gewaschen, bis sich der Hintergrund entfärbt hatte und die Proteinbanden gut sichtbar waren. Vor der Immundetektion wurde die Membran vollständig mit deionisiertem Wasser entfärbt.

Ponceau-Färbelösung:	0,2 % (w/v)	Ponceau S
	3 % (w/v)	Trichloressigsäure

2.4.12 Immundetektion von Proteinen

Zum Nachweis auf der Membran immobilisierter Proteine wurden verschiedene spezifische Antikörper verwendet (Tab. 10). Dazu wurden zunächst unspezifische Bindestellen auf der Membran abgesättigt, indem die Membran für mindestens 2 Stunden in 4 % Blockierungslösung (4 % Magermilchpulver (Sucofin) angesetzt in 1 x TBS) blockiert wurde. Anschließend wurde die Membran bei Raumtemperatur zweimal kurz mit 1 x TBST gespült sowie 15 Minuten und zweimal 5 Minuten schwenkend in 1 x TBST gewaschen. Der Primärantikörper wurde, wenn nicht anders angegeben, in Blockierungslösung angesetzt (Tab. 10) und schwenkend bei 4 °C über Nacht auf der Membran inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Membran wie oben beschrieben mit 1 x TBST gewaschen und für 1 Stunde mit dem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper (HRP, *horseradish peroxidase*), der in 1 % BSA in 1 x TBS angesetzt wurde, bei Raumtemperatur schwenkend inkubiert. Die an den sekundären Antikörper gekoppelte Peroxidase ermöglicht die Detektion des gewünschten Proteins über Chemilumineszenz. Die Membran wurde danach zweimal kurz

mit 1 x TBST gespült sowie 20 Minuten und viermal 5 Minuten schwenkend in 1 x TBST gewaschen. Anschließend erfolgte die Detektion mit dem *Pierce™ Western Blot Signal Enhancer* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), dem *Amersham™ ECL Select™ Western Blotting Detection Reagent* (GE Healthcare, Freiburg) oder mit *Lumigen® ECL Ultra TMA-6* (Lumigen, Southfield, MI, USA) nach Angaben des Herstellers. Die Chemilumineszenz wurde in einer ECL-Kassette durch Exposition eines Röntgenfilms (Super RX-N, Fujifilm Corporation, Tokio, Japan; Amersham Hyperfilm™ MP, GE Healthcare, Buckinghamshire, England) detektiert. Der Film wurde so lange im Entwickler (Tetenal, Norderstedt) geschwenkt bis Signale sichtbar wurden. Danach wurde der Film in Leitungswasser gespült und durch Inkubation im Fixierer (Tetenal, Norderstedt) für 10 Minuten fixiert. Der Film wurde anschließend zuerst in Leitungswasser, dann in deionisiertem Wasser gespült und getrocknet.

Tab. 10: Auflistung der verwendeten Antikörper.

* Blockieren in 1 x PBS (modifiziert) (4 mM KH₂PO₄, 16 mM Na₂HPO₄, 115 mM NaCl, pH 7,4) + 3 % (w/v) BSA und + 0,5 % (v/v) Tween 20, Waschen in 1 x PBST (modifiziert) (1 x PBS (modifiziert) + 0,1 % (v/v) Tween 20). Sekundärantikörper: α-Maus = AS09627, Agrisera; α-Kaninchen = AS09602, Agrisera; α-Huhn = A9046, Sigma Aldrich.

Primärantikörper	Verdünnung	Sekundärantikörper	Verdünnung	Herkunft
α-DNA	1:1.000	α-Maus	1:50.000	Boehringer
α-HvWHIRLY1 (second Peptidantikörper)	1:1.500	α-Kaninchen	1:150.000	Grabowski 2008
Strep-Tactin®-HRP-Konjugate	1:20.000*	-	-	IBA, 2-1502-001
α-LHCB1	1:2.000	α-Kaninchen	1:50.000	Agrisera, AS01004
α-MFP1	1:500	α-Kaninchen	1:20.000	Jeong et al. 2003
α-PsbA	1:4.000	α-Huhn	1:50.000	Agrisera, AS01016
α-pTAC12	1:4.000	α-Kaninchen	1:100.000	Pfalz et al. 2015
α-TCP34	1:1.000	α-Kaninchen	1:25.000	Weber et al. 2006
α-ZmWHIRLY1	1:500	α-Kaninchen	1:100.000	J. Pfalz, Jena

1 x TBS(T):
 10 mM Tris
 150 mM NaCl
 (0,5 % (v/v) Tween 20)
 pH 7,5 mit HCl einstellen

2.4.13 Densitometrische Auswertung

Die densitometrische Auswertung diente der Quantifizierung der mittels Chemilumineszenz erzeugten Signale bei der immunologischen Detektion von Proteinen. Für die Auswertung wurde das Programm ImageJ (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA) verwendet.

2.5 Datenbanken und Internetseiten

Die folgenden Datenbanken und Internetseiten wurden verwendet:

- *QuikChange Primer Design*;
<http://www.genomics.agilent.com/primerDesignProgram.jsp>
- *National Center for Biotechnology Information (NCBI)*; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- *The Sequence Manipulation Suite*; <http://www.bioinformatics.org/sms2/>
- *Primer3*; <http://frodo.wi.mit.edu/>
- *MUSCLE*; <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>
- *iPSORT*; <http://ipsort.hgc.jp/>
- *TargetP*; <http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>
- *ExPASy*; http://web.expasy.org/compute_pi/

Das Programm Geneious R8.1.6 (Biomatters Ltd.) wurde zur Anfertigung von Sequenzvergleichen und zur Erstellung von Stammbäumen verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Einfluss von WHIRLY1 auf die plastidären Nukleotide in Gerste

3.1.1 Untersuchungen zur entwicklungsabhängigen Regulation von WHIRLY1

Zur Untersuchung von entwicklungsabhängigen Prozessen sind monokotyle Pflanzen wie die Gerste besonders geeignet, da die Primärblätter einen Altersgradienten von der Blattbasis zur Blattspitze aufweisen. Die jüngsten Zellen sind dabei an der Basis und die ältesten an der Spitze zu finden (Krupinska & Falk 1994).

Die entwicklungsabhängige Expression des *HvWHIRLY1*-Gens und die Proteinakkumulation von HvWHIRLY1 wurden in sieben Tage alten Primärblättern der Gerste untersucht. Dazu wurden drei Blattsegmente mit jeweils einer Länge von 1,5 cm aus unterschiedlichen Entwicklungsstadien analysiert (Abb. 6A). Das basale Blattsegment (B) enthält meristematische Zellen und junge Mesophyllzellen, das mittlere Blattsegment (M) junge Mesophyllzellen und die Blattspitze (S) vollständig ausdifferenziertes Mesophyllgewebe. Zur Untersuchung der Expression des *HvWHIRLY1*-Gens im Wildtyp wurde RNA aus den drei Blattsegmenten isoliert (2.3.12), in cDNA umgeschrieben (2.3.13) und für eine qRT-PCR (2.3.14) verwendet. Es ist zu erkennen, dass die Expression des *HvWHIRLY1*-Gens im meristematischen Gewebe (Basis; B) am höchsten ist und mit zunehmender Differenzierung des Gewebes zur Blattmitte und -spitze hin abnimmt (Abb. 6B). Die Akkumulation des HvWHIRLY1-Proteins wurde immunologisch unter Verwendung des α -HvWHIRLY1-Antikörpers untersucht. Dazu wurde Gesamtprotein aus den drei Blattsegmenten des Wildtyps isoliert (2.4.4), in einem SDS-PA-Gel aufgetrennt (2.4.8) und anschließend auf eine Membran transferiert (2.4.10). Danach erfolgte der immunologische Nachweis mittels Antikörper (2.4.12). Die Detektion von HvWHIRLY1 zeigt, dass die entwicklungsabhängige Akkumulation des Proteins unabhängig von der Transkriptmenge erfolgt (Abb. 6C). Die HvWHIRLY1-Proteinmenge nimmt vom basalen zum mittleren Blattsegment zu, wo in jungen Mesophyllzellen (Mitte; M) die größte Menge detektiert werden kann. Während der weiteren Differenzierung des Gewebes sinkt die HvWHIRLY1-Proteinmenge in der Blattspitze wieder auf das Niveau des basalen Segmentes. Diese Befunde stehen im Einklang mit den Ergebnissen von Grabowski (2008).

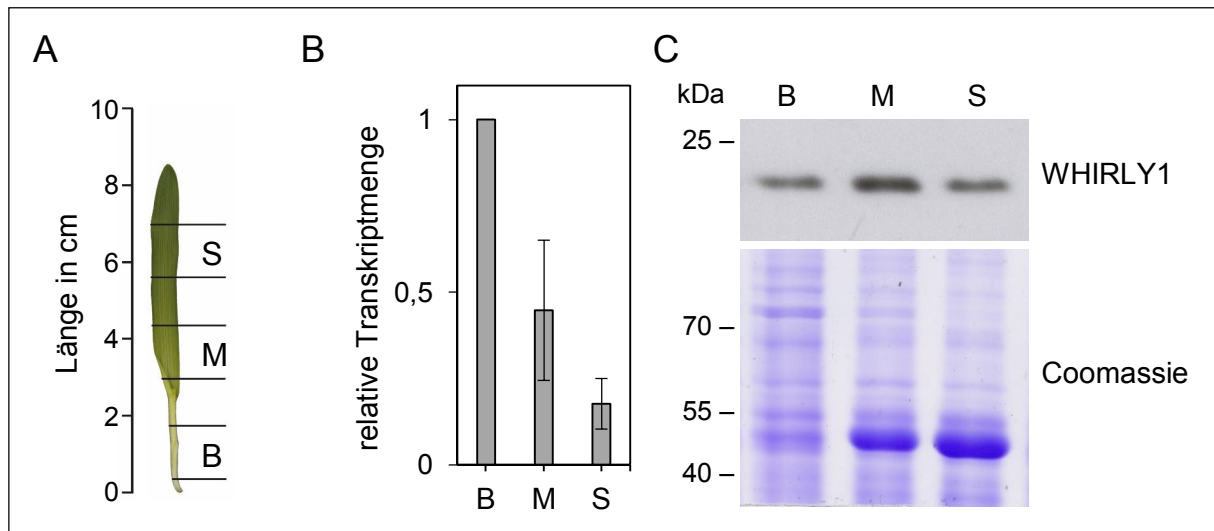


Abb. 6: Entwicklungsabhängige Veränderungen in der Menge der *HvWHIRLY1*-mRNA und des *HvWHIRLY1*-Proteins in einem sieben Tage alten Gerstenprimärblatt.

A Darstellung des basalen (B), mittleren (M) und apikalen (S) Blattsegmentes eines sieben Tage alten Primärblattes der Gerste. **B** Transkriptmenge des *HvWHIRLY1*-Gens in den zu untersuchenden Blattsegmenten. Mit cDNA aus den drei Segmenten wurde eine qRT-PCR durchgeführt. Die Werte wurden auf die *18S rRNA* normalisiert. Die Transkriptmenge im basalen Segment wurde auf den Wert 1 normiert, alle anderen Transkriptmengen sind im Verhältnis dazu dargestellt. Die Standardabweichungen wurden basierend auf drei technischen Replikaten berechnet. **C** Immunologischer Nachweis von *HvWHIRLY1* in Gesamtproteinextrakten aus den drei Blattsegmenten. Es wurde der Antikörper gegen *HvWHIRLY1* eingesetzt. Als Beladungskontrolle wurde der obere Teil des SDS-PA-Gels mit Coomassie-Brilliantblau gefärbt, während der untere Teil für den Western Blot verwendet wurde.

3.1.2 Untersuchungen zum Einfluss des WHIRLY1-Proteins auf die Struktur plastidärer Nucleoide

Immunologische Untersuchungen und Proteomanalysen ergaben, dass das WHIRLY1-Protein von Gerste und *Arabidopsis* Bestandteil des TAC ist (Pfalz et al. 2006; Melonek et al. 2010). Darüber hinaus konnte das WHIRLY1-Protein des Maises in den plastidären Nucleoiden identifiziert werden (Majeran et al. 2012). Kolokalisationsstudien mit dem nucleoidassoziierten Protein PEND zeigten hingegen, dass WHIRLY1 in der Gerste nur mit einem Teil der plastidären Nucleoide assoziiert ist (Melonek et al. 2010).

Um den Einfluss von WHIRLY1 auf die Struktur der plastidären Nucleoide in der Gerste zu untersuchen, wurden die Nucleoide des Wildtyps sowie zweier WHIRLY1-RNAi-Linien 1 und 7 (W1-1 und W1-7) mikroskopisch untersucht. Bei W1-1 und W1-7 handelt es sich um mittels RNAi erzeugte *knock-down*-Linien, welche im Vergleich zum Wildtyp eine reduzierte Menge an *HvWHIRLY1*-Protein enthalten. Immunologisch konnte gezeigt werden, dass die *HvWHIRLY1*-Proteinmenge in W1-1 weniger als 10 % des Wildtyps beträgt, während in W1-7 in 16 µg Gesamtproteinextrakt kein Protein nachweisbar ist (Tab. 11). Die Nucleoide im Wildtyp und in den WHIRLY1-RNAi-Linien wurden vergleichend in jungen Chloroplasten der Blattmitte sowie in ausdifferenzierten Chloroplasten der Blattspitze betrachtet. Dazu

wurden Querschnitte im mittleren Blattsegment in jungem Mesophyllgewebe und 2 cm unterhalb der Blattspitze in ausdifferenziertem Mesophyllgewebe angefertigt (siehe Abb. 6A). Zur Visualisierung der plastidären Nukleole wurden die Querschnitte mit dem DNA-spezifischen Fluoreszenzfarbstoff YO-PRO®-1 behandelt (2.3.15). Die Querschnitte wurden unter dem Konfokalmikroskop betrachtet (2.3.16).

Tab. 11: Reduktion der HvWHIRLY1-Proteinmenge in den beiden WHIRLY1-RNAi-Linien 1 (W1-1) und 7 (W1-7) in Bezug zur Proteinmenge des Wildtyps (WT).

Die angegebenen Proteinmengen basieren auf der densitometrischen Auswertung eines Western Blots. n.d. = HvWHIRLY1 in 16 µg Gesamtproteinextrakt immunologisch nicht detektierbar.

Genotyp	HvWHIRLY1-Proteinmenge
WT	100 %
W1-1	6,25–10 %
W1-7	n.d.

Die Nukleole sind in den jungen Chloroplasten des mittleren Blattsegmentes des Wildtyps (WT) in Form von diffusen und nicht klar abzugrenzenden Strukturen erkennbar (Abb. 7). Die Nukleole scheinen über die gesamten Chloroplasten verteilt zu sein, wobei einige punktförmige Strukturen zum Teil in der Peripherie der Chloroplasten (siehe Pfeilspitzen in Abb. 7) und zum anderen Teil an den Thylakoiden (siehe Pfeile in Abb. 7) lokalisiert sind. Ähnlich zu den Nukleolen des Wildtyps sind die Nukleole der beiden WHIRLY1-RNAi-Linien mittels YO-PRO®-1 als diffuse Signale, die über die Chloroplasten verstreut sind, detektierbar. Daneben weisen die beiden WHIRLY1-RNAi-Linien deutlich vergrößerte Nukleole auf, die im Unterschied zum Wildtyp als diskrete Strukturen in der Peripherie der jungen Chloroplasten zu erkennen sind (siehe Pfeilspitzen in Abb. 7). In W1-7 sind erheblich mehr dieser vergrößerten Nukleole anfärbbar als in W1-1. Auffällig ist, dass die vergrößerten Nukleole in den beiden WHIRLY1-RNAi-Linien fast ausschließlich in der Peripherie der Chloroplasten lokalisiert sind.

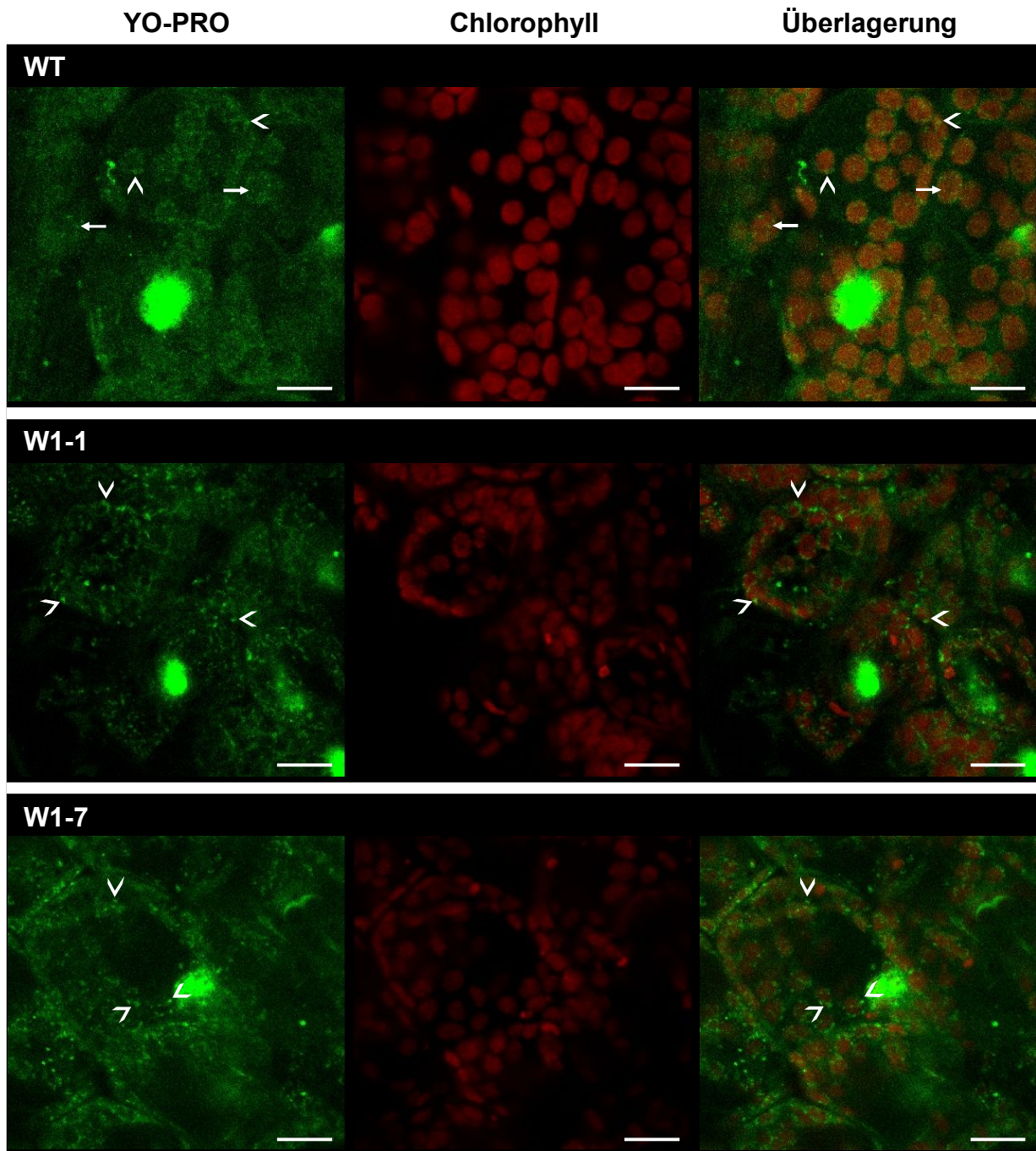


Abb. 7: Morphologie plastidärer Nukleotide in jungen Chloroplasten des Wildtyps (WT) und der WHIRLY1-RNAi-Linien 1 (W1-1) und 7 (W1-7).

Die Querschnitte wurden im mittleren Segment von sieben Tage alten Primärblättern angefertigt. Die Färbung mit YO-PRO®-1 erfolgte an fixierten Blattquerschnitten. Links ist die Fluoreszenz der mit YO-PRO®-1 angefärbten DNA in grün, in der Mitte die Autofluoreszenz des Chlorophylls in rot und rechts die Überlagerung beider Fluoreszenzen dargestellt. Nukleotide an den Thylakoiden sind mit Pfeilen (→) und Nukleotide in der Peripherie sind mit Pfeilspitzen (>) markiert. Messbalken = 10 µm.

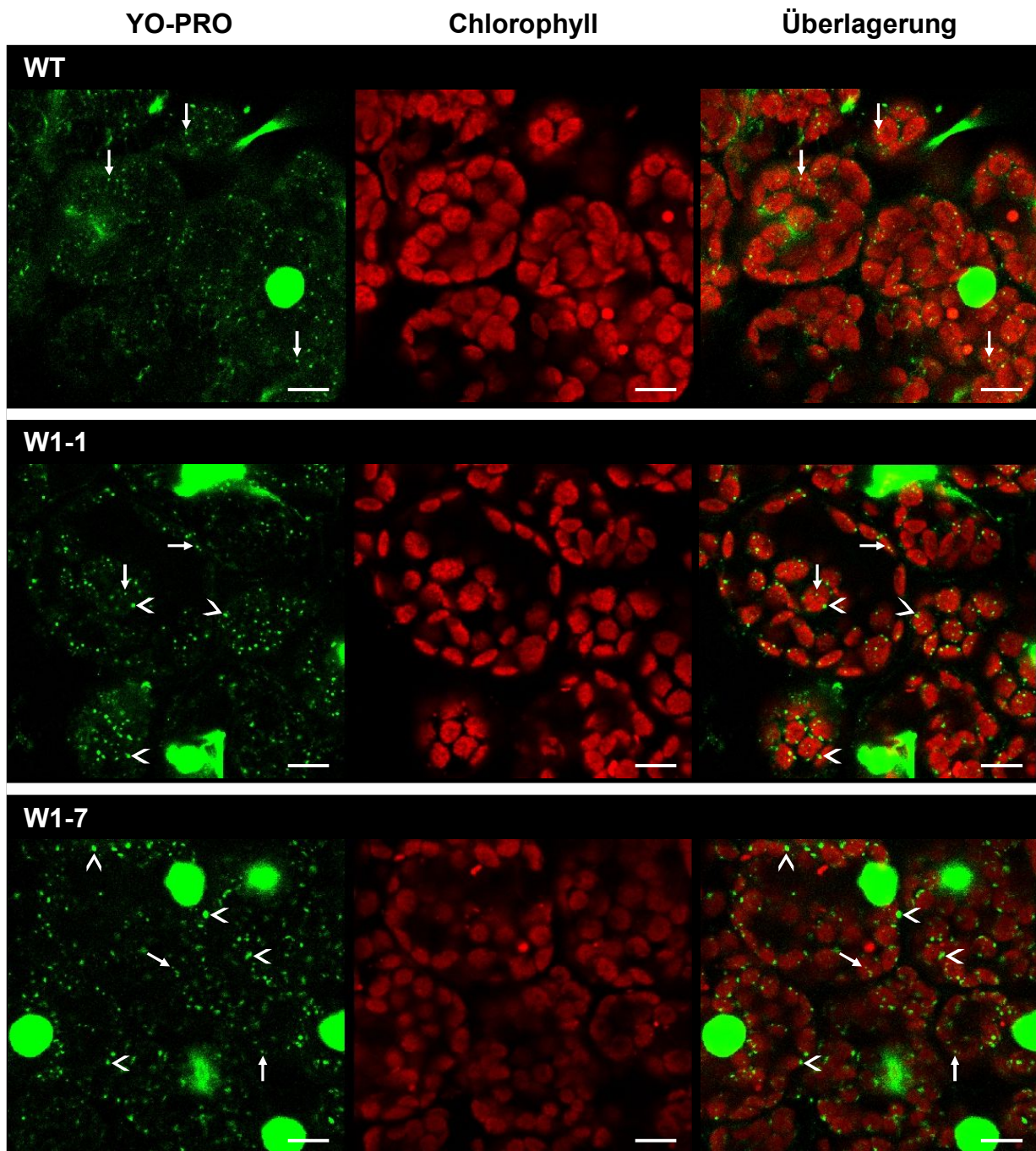


Abb. 8: Morphologie plastidärer Nukleotide in ausdifferenzierten Chloroplasten des Wildtyps (WT) und der WHIRLY1-RNAi-Linien 1 (W1-1) und 7 (W1-7).

Die Querschnitte wurden 2 cm unterhalb der Blattspitze von sieben Tage alten Primärblättern angefertigt. Die Färbung mit YO-PRO®-1 erfolgte an fixierten Blattquerschnitten. Links ist die Fluoreszenz der mit YO-PRO®-1 angefärbten DNA in grün, in der Mitte die Autofluoreszenz des Chlorophylls in rot und rechts die Überlagerung beider Fluoreszenzen dargestellt. Kleine für den Wildtyp typische Nukleotide sind mit Pfeilen (→) und vergrößerte Nukleotide sind mit Pfeilspitzen (>) markiert. Messbalken = 10 µm.

Anders als in der Blattmitte sind die Nukleotide in der Blattspitze des Wildtyps (WT) innerhalb der Chloroplasten als kleine punktförmige Strukturen an den Thylakoiden zu erkennen (siehe Pfeile in Abb. 8). Bei Betrachtung der Nukleotide in den WHIRLY1-RNAi-Linien fällt auf, dass

die Nukleole beider Linien zum Teil deutlich vergrößert sind (siehe Pfeilspitzen in Abb. 8), wie bereits in den jungen Chloroplasten der Blattmitte zu erkennen ist (Abb. 7). Allerdings sind sowohl in W1-1 als auch in W1-7 neben den vergrößerten Nukleolen auch kleine Nukleole wie im Wildtyp zu sehen (siehe Pfeile in Abb. 8). Das deutet auf zwei unterschiedliche Nukleolopopulationen in den RNAi-Linien hin. Auffällig ist, dass die Veränderung der Nukleologröße in W1-7 stärker ausfällt als in W1-1, was vermutlich auf die unterschiedlichen Mengen an HvWHIRLY1-Protein in den beiden Linien zurückzuführen ist. W1-7, in der mittels Western Blot keine detektierbare HvWHIRLY1-Proteinmenge nachweisbar ist (Tab. 11), weist stärkere morphologische Veränderungen der Nukleole auf als W1-1, welche noch maximal 10 % der HvWHIRLY1-Proteinmenge des Wildtyps enthält (Tab. 11). Die innerhalb der Zelle verfügbare Menge an HvWHIRLY1 hat somit einen direkten Einfluss auf die Morphologie der Nukleole. Als Ursache für die vergrößerten Nukleole in den WHIRLY1-RNAi-Linien wäre eine größere Menge an ptDNA und/oder eine reduzierte Kompaktierung der Nukleole denkbar.

Zur Prüfung der ersten Hypothese, ob die vergrößerten Nukleole in W1-1 und W1-7 mit einer veränderten Menge an ptDNA einhergehen, wurde gDNA aus sieben Tage alten Primärblättern des Wildtyps und der Linien W1-1 und W1-7 isoliert (2.3.10) und für eine qPCR (2.3.11.2) sowie für einen DNA Dot-Blot (2.3.11.1) verwendet. Die qPCR erfolgte mit spezifischen Oligonukleotiden für die nukleären Gene *18S rDNA* und *RBCS* sowie die plastidären Gene *petD* und *psbA*. Für den DNA Dot-Blot wurden unterschiedliche Mengen gDNA des Wildtyps und der Linie W1-7 mit Hilfe einer Dot-Blot-Apparatur auf eine positiv geladene Nylonmembran transferiert (2.3.11.1). Zum Nachweis der Kern-DNA wurde eine kernspezifische Sonde, die gegen das *18S rDNA*-Gen gerichtet war, und zum Nachweis der ptDNA wurde eine plastidenspezifische Sonde gegen das *petD*-Gen verwendet. Während die Menge der Kern-DNA im Wildtyp und in den beiden WHIRLY1-RNAi-Linien 1 und 7 im sieben Tage alten Primärblatt vergleichbar ist, kann eine erhöhte Menge ptDNA in den beiden RNAi-Linien mittels qPCR nachgewiesen werden (Abb. 9A). In W1-1 ist der ptDNA-Gehalt um 50 % und in W1-7 sogar um 100 % im Vergleich zum Wildtyp erhöht. Dieses Ergebnis konnte für W1-7 mit Hilfe eines DNA Dot-Blots bestätigt werden (Abb. 9B). Wie bei der qPCR zeigen die Hybridisierungssignale der *18S rDNA*-Sonde zwischen Wildtyp und W1-7 keinen Unterschied in der Menge der Kern-DNA (Abb. 9B, linke Seite), während mit Hilfe der *petD*-Sonde eine Erhöhung des ptDNA-Gehalts um etwa 100 % für W1-7 detektiert werden kann (Abb. 9B, rechte Seite). Die Struktur der Nukleole und der ptDNA-Gehalt gehen demnach mit der HvWHIRLY1-Proteinmenge einher. Umso weniger HvWHIRLY1-Protein vorhanden ist, desto stärker sind die morphologischen Auswirkungen auf die Nukleole, wie bei W1-7 zu sehen ist. Allerdings scheinen nicht alle Nukleole im gleichen Maß verändert zu sein. So ist nur eine Teilpopulation der Nukleole in ausdifferenzierten

Chloroplasten der Linien W1-1 und W1-7 von der Strukturänderung betroffen (Abb. 8). Dies stimmt mit den Beobachtungen von Melonek et al. (2010), dass HvWHIRLY1 nur mit einem Teil der Nukleole in den Chloroplasten kolokalisiert, überein. Ein Zusammenhang zwischen der reduzierten HvWHIRLY1-Proteinmenge, den vergrößerten Nukleolen und einer erhöhten Menge an ptDNA in den WHIRLY1-RNAi-Linien kann damit bestätigt werden. Zudem ist auch ein Einfluss von HvWHIRLY1 auf die Kompaktierung der plastidären Nukleole mittels Transmissionselektronenmikroskopie zu beobachten (Krupinska et al. 2014a). Die Aufnahmen der Linie W1-7 zeigen neben deutlich vergrößerten Nukleolen eine reduzierte Kompaktierung der Nukleole im Vergleich zum Wildtyp. Die ptDNA ist in W1-7 weniger verpackt, was an fädigen Strukturen, die aus den Nukleolen herausragen, deutlich wird. Folglich hat die reduzierte HvWHIRLY1-Proteinmenge auch einen Effekt auf den Verpackungsgrad der plastidären Nukleole.

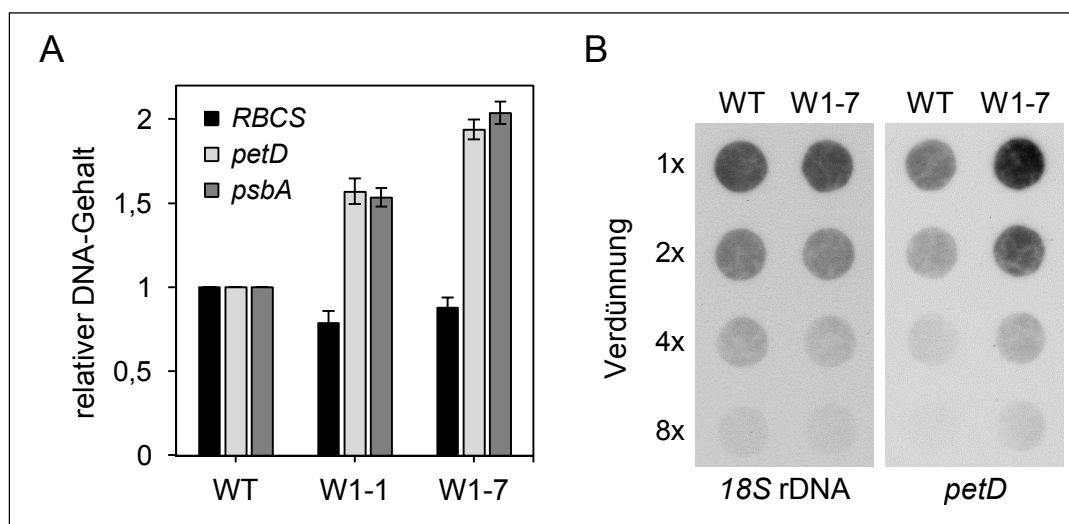


Abb. 9: DNA-Gehalt in sieben Tage alten Primärblättern des Wildtyps (WT) und der WHIRLY1-RNAi-Linien 1 (W1-1) und 7 (W1-7).

A qPCR mit gDNA aus sieben Tage alten Primärblättern des Wildtyps und der Linien W1-1 und W1-7. Es wurden spezifische Oligonukleotide für die nukleären Gene *18S rDNA* und *RBCS* sowie für die plastidären Gene *petD* und *psbA* verwendet. Die Werte wurden auf die *18S rDNA* normalisiert. Der DNA-Gehalt des Wildtyps wurde auf den Wert 1 normiert, die anderen Werte sind im Verhältnis dazu dargestellt. Die Standardabweichungen wurden basierend auf drei technischen Replikaten berechnet. **B** DNA Dot-Blot mit gDNA aus sieben Tage alten Primärblättern des Wildtyps und der Linie W1-7. Es wurden unterschiedliche Mengen gDNA (Verdünnung 1x, 2x, 4x und 8x) auf eine positiv geladene Nylonmembran überführt. Die kernspezifische Sonde war gegen das *18S rDNA*-Gen, die plastidenspezifische Sonde gegen das *petD*-Gen gerichtet. Zum Nachweis der DIG-markierten Sonden wurde ein α -DIG-AP Antikörper verwendet.

Aus Arbeiten von Baumgartner et al. (1989) ist bekannt, dass der ptDNA-Gehalt in Blättern entwicklungsabhängigen Schwankungen unterliegt. Im Gerstenprimärblatt nimmt der ptDNA-Gehalt während der frühen Differenzierung der Mesophyllzellen von den meristematischen Zellen an der Blattbasis hin zur Blattmitte stetig zu. In den jungen Chloroplasten der

Blattmitte erreicht der DNA-Gehalt sein Maximum, und während der weiteren Entwicklung zu ausdifferenzierten Chloroplasten in der Blattspitze sinkt der ptDNA-Gehalt wieder ab. Um zu untersuchen, ob die ptDNA in der WHIRLY1-RNAi-Linie 7 in bestimmten Entwicklungsstadien erhöht ist, wurde gDNA aus dem basalen, mittleren und apikalen Blattsegment des Wildtyps und der Linie W1-7 (Kapitel 3.1.1, Abb. 6A) isoliert (2.3.10) und wie zuvor für eine qPCR verwendet (2.3.11.2).

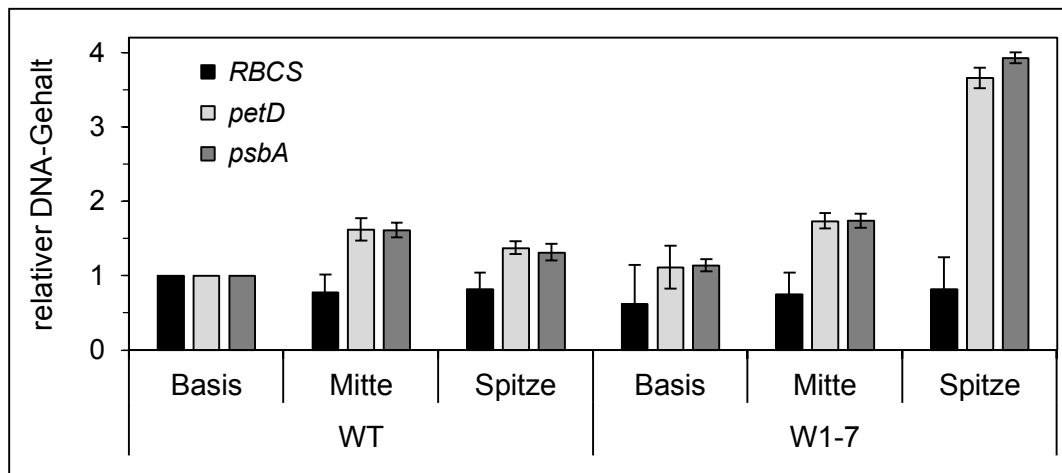


Abb. 10: Entwicklungsabhängige Veränderungen des DNA-Gehalts in sieben Tage alten Primärblättern des Wildtyps (WT) und der WHIRLY1-RNAi-Linie 7 (W1-7).

qPCR mit gDNA aus dem basalen (Basis), mittleren (Mitte) und apikalen (Spitze) Blattsegment von sieben Tage alten Primärblättern des Wildtyps und der Linie W1-7. Es wurden spezifische Oligonukleotide für die nukleären Gene *18S rDNA* und *RBCS* sowie für die plastidären Gene *petD* und *psbA* verwendet. Die Werte wurden auf die *18S rDNA* normalisiert. Der DNA-Gehalt in den Segmenten des Wildtyps wurde auf den Wert 1 normiert, die anderen Werte sind im Verhältnis dazu dargestellt. Die Standardabweichungen wurden basierend auf drei technischen Replikaten berechnet.

Um die entwicklungsabhängigen Schwankungen im Wildtyp und in W1-7 vergleichen zu können, sind die ermittelten Werte im Verhältnis zur DNA-Menge im Kern und in den Plastiden in der Blattbasis des Wildtyps dargestellt (Abb. 10). Die Menge an Kern-DNA ist in den drei Segmenten des Wildtyps und der Linie W1-7 bis auf kleine Schwankungen vergleichbar. Im Wildtyp ist eine entwicklungsabhängige Zunahme der ptDNA vom basalen zum mittleren Blattsegment um 60 % und eine Abnahme vom mittleren zum apikalen Blattsegment um 30 % im Vergleich zur Blattbasis zu erkennen. Diese entwicklungsabhängigen Veränderungen stimmen mit denen von Baumgartner et al. (1989) überein. Im basalen und mittleren Blattsegment der Linie W1-7 können keine Veränderungen der ptDNA-Menge im Vergleich zum Wildtyp beobachtet werden. Wie im Wildtyp ist ein Anstieg des ptDNA-Gehalts von der Blattbasis zur -mitte um 60 % messbar. Veränderungen sind erst im Spitzensegment der Linie W1-7 zu sehen. So nimmt der ptDNA-Gehalt von der Blattmitte zur -spitze noch einmal um mehr als 100 % zu (für *petD* um 110 %, für *psbA* um 126 %). Damit

enthalten die Chloroplasten in der Blattspitze der Linie W1-7 fast dreimal mehr DNA als vom Wildtyp, wenn die Mittelwerte von *petD* und *psbA* in der Blattspitze des Wildtyps mit denen der Linie W1-7 verglichen werden (Erhöhung um 184 %). Dieses Ergebnis zeigt, dass die reduzierte HvWHIRLY1-Proteinmenge in W1-7 nur während der Ausdifferenzierung der Chloroplasten von der Blattmitte zur -spitze Auswirkungen auf den ptDNA-Gehalt hat und nicht in früheren Entwicklungsstadien.

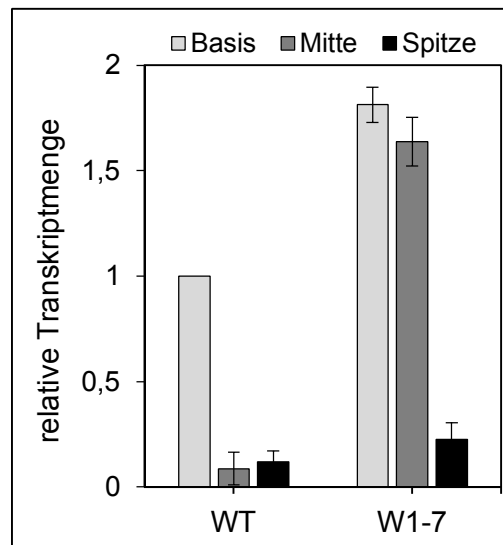


Abb. 11: Analyse der relativen Transkriptmenge des *HvPolII-like*-Gens im Entwicklungsgradienten eines sieben Tage alten Gerstenprimärblattes des Wildtyps (WT) und der WHIRLY1-RNAi-Linie 7 (W1-7).

Mit cDNA aus dem basalen (Basis), mittleren (Mitte) und apikalen (Spitze) Blattsegment wurde eine qRT-PCR durchgeführt. Die Werte wurden auf die *18S rRNA* normalisiert. Die Transkriptmenge in der Blattbasis des Wildtyps wurde auf den Wert 1 normiert. Alle anderen Transkriptmengen sind im Verhältnis dazu dargestellt. Die Standardabweichungen wurden basierend auf drei technischen Replikaten berechnet.

Datenbankrecherchen ermöglichten die Identifizierung einer organellären DNA Polymerase in der Gerste, welche HvPolII-like genannt wurde (Krupinska et al. 2014a). Zur Ermittlung der Transkriptmenge des *HvPolII-like*-Gens in den unterschiedlichen Entwicklungsstadien des Gerstenprimärblattes wurde Gesamt-RNA aus dem basalen, mittleren und apikalen Segment des Wildtyps und der Linie W1-7 isoliert (2.3.12), in cDNA umgeschrieben (2.3.13) und für eine qRT-PCR verwendet (2.3.14). Im Wildtyp ist die größte Transkriptmenge des *HvPolII-like*-Gens in der Blattbasis messbar (Abb. 11). In der Blattmitte und -spitze ist die Transkriptmenge deutlich reduziert. So sind in der Blattmitte nur noch 8,6 % und in der Blattspitze noch 11,7 % von der Transkriptmenge in der Blattbasis nachweisbar. Im Laufe der Differenzierung der Chloroplasten nimmt die Expression der organellären DNA Polymerase im Wildtyp demnach stark ab. In W1-7 ist die Expression in allen drei Blattsegmenten höher als im Wildtyp. Im basalen Blattsegment der Linie W1-7 ist die Transkriptmenge des *HvPolII-like*-Gens um 80 %, in der Blattmitte um 1200 % und in der

Blattspitze um 100 % erhöht. Im Unterschied zum Wildtyp kommt es in W1-7 erst im Spitzensegment zu einer deutlichen Abnahme der Transkriptmenge. Wie zuvor gezeigt werden konnte, ist die Menge an ptDNA nur in der Blattspitze der Linie W1-7 erhöht (Abb. 10). Im Vergleich dazu ergibt die Analyse der Transkriptmenge eine verstärkte Expression von *HvPoll-like* in allen drei Segmenten, wobei die größte Erhöhung im mittleren Blattsegment messbar ist.

3.2 Untersuchungen zum Einfluss von WHIRLY-Proteinen auf die Struktur von Nukleoiden in *E. coli*

Die vorangegangenen Untersuchungen ergaben, dass das WHIRLY1-Protein der Gerste einen Einfluss auf die Struktur und Kompaktierung der Nukleoide in den Chloroplasten hat. Auf Grund des endosymbiontischen Ursprungs der Plastiden ähnelt die Organisation der ptDNA der von Bakterien mit dem Unterschied, dass Bakterien wie *E. coli* nur über ein einzelnes Nukleoid verfügen (Macvanin & Adhya 2012), während die Anzahl der Nukleoide in Plastiden variabel ist (Powikrowska et al. 2014a). Um zu prüfen, ob WHIRLY-Proteine auch einen Effekt auf die Kompaktierung bakterieller Nukleoide haben, wurden heterologe Expressionsstudien mit den WHIRLY-Genen aus Gerste, Arabidopsis und Mais in *E. coli* durchgeführt.

3.2.1 Einfluss des WHIRLY1-Proteins der Gerste auf die Kompaktierung bakterieller Nukleoide von *E. coli*

Um den Einfluss des WHIRLY1-Proteins der Gerste auf die bakteriellen Nukleoide zu untersuchen, wurde die Sequenz, die für das reife HvWHIRLY1-Protein kodiert, in den Expressionsvektor pASK-IBA3 kloniert und in Zellen von *E. coli* DH5 α transformiert (2.3.3.4 und 2.3.7.3). Anschließend wurde ein Wachstumsversuch mit Zellen, die das pASK-IBA3/HvWHY1-Konstrukt bzw. den leeren Vektor pASK-IBA3 enthielten, durchgeführt (2.3.3.7). Um einen möglichen Einfluss des Vektors pASK-IBA3 auf das Zellwachstum ausschließen zu können, dienten Zellen, die den Leervektor enthielten, als Kontrolle. Darüber hinaus konnte mit Hilfe der Kontrollzellen eine antibakterielle Wirkung des für die Überexpression als Induktor verwendeten Antibiotikums Anhydrotetracyclin (A), welches ohnehin nur als schwaches Antibiotikum eingestuft wird, ausgeschlossen werden. Die Flüssigkulturen wurden zum Zeitpunkt „0“ mit 0,2 μ M Anhydrotetracyclin induziert (Abb. 12). *E. coli*-Zellen, die das HvWHIRLY1-Gen überexprimieren (HvWHY1 +A), zeigen bereits zwei Stunden nach der Induktion ein deutlich reduziertes Wachstum im Unterschied zu Zellen, in denen die HvWHIRLY1-Überexpression (HvWHY1 -A) nicht induziert worden ist oder die den Leervektor enthalten (pASK-IBA3 +A und -A). Das geringere Zellwachstum nach Expression des HvWHIRLY1-Gens kann über die gesamte Messdauer von sieben bzw. 22 Stunden beobachtet werden. Wie in Kontrollzellen ist nach Induktion der HvWHIRLY1-Überexpression bis sieben Stunden nach der Induktion stündlich ein stetiger Anstieg der

Zellichte (OD_{600}) messbar. Eine Zelldichte von 1,4 wird allerdings nicht überschritten, während die Kontrollzellen eine Zelldichte von 2,0 erreichen.

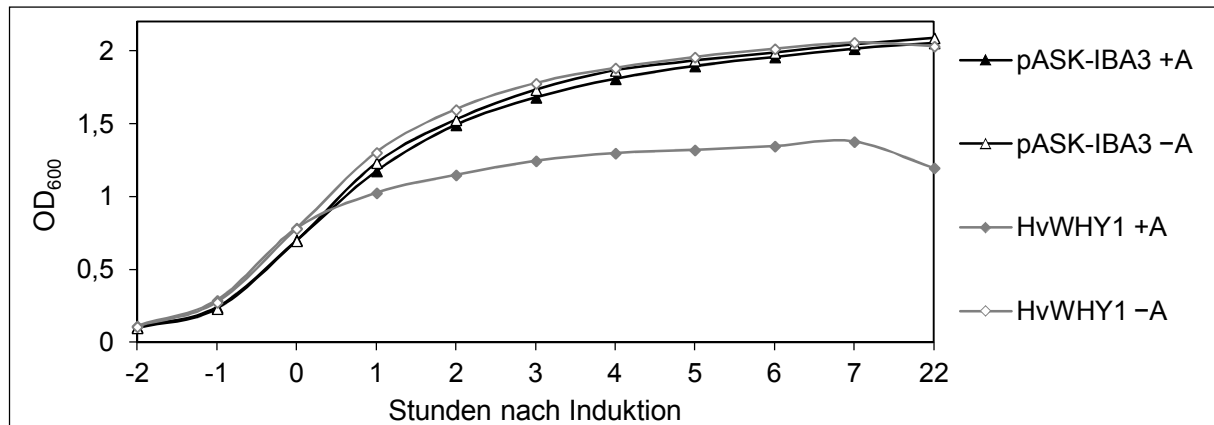


Abb. 12: Zellwachstum von *E. coli* nach heterologer Überexpression des rekombinanten *WHIRLY1*-Gens der Gerste.

Für die Überexpression wurde das Konstrukt pASK-IBA3/HvWHY1 (HvWHY1) verwendet. In dem Konstrukt ist die kodierende Sequenz für das reife HvWHIRLY1-Protein am 3'-Ende mit der Sequenz für einen Strep-Tag fusioniert. Die Induktion der Überexpression erfolgte zum Zeitpunkt „0“ mit 0,2 μ M Anhydrotetracyclin. *E. coli*-Zellen mit dem pASK-IBA3-Leervektor (pASK-IBA3) dienen als Kontrolle. +A = Induktion mit 0,2 μ M Anhydrotetracyclin, -A = keine Induktion, OD_{600} = optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm.

Die Synthese des rekombinanten HvWHIRLY1-Proteins wurde immunologisch mit Proteinextrakten aus Zellen, die stündlich nach der Induktion abgenommen, pelletiert und entsprechend der optischen Dichte in 1 x PSB resuspendiert wurden (2.4.1), überprüft (Abb. 13). Die Detektion des rekombinanten HvWHIRLY1-Proteins erfolgte mit dem α -HvWHIRLY1-Antikörper (2.4.10 und 2.4.12). Das rekombinante HvWHIRLY1-Protein kann auf Höhe der 27 kDa großen Markerbande detektiert werden (Abb. 13). Die HvWHIRLY1-Proteinmenge ist ein bis drei Stunden nach der Induktion der Überexpression am höchsten und nimmt danach kontinuierlich ab. Neben der 27 kDa großen Bande für das rekombinante HvWHIRLY1-Protein sind bis zu vier weitere Banden mit dem α -HvWHIRLY1-Antikörper nachweisbar (markiert mit Sternen in Abb. 13). Diese Banden sind nur in den Bakterienlysaten nach Induktion der *HvWHIRLY1*-Expression und nicht in denen des Leervektors pASK-IBA3 nachweisbar, so dass es sich bei diesen zusätzlichen Banden um Abbauprodukte bzw. modifizierte Formen des HvWHIRLY1-Proteins handeln könnte.

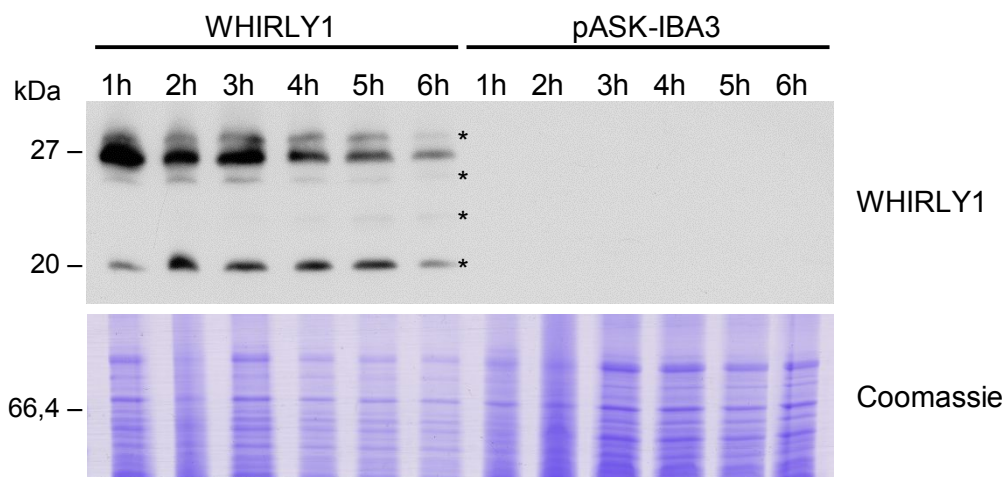


Abb. 13: Immunologischer Nachweis des rekombinanten HvWHIRLY1-Proteins.

Ein bis sechs Stunden nach der Induktion (1h–6h) wurde jeweils 1 ml Flüssigkultur abgenommen. In Abhängigkeit von der gemessenen Zelldichte bei OD_{600} wurde die aus 1 ml Flüssigkultur pelletierten Zellen in 1 x PSB aufgenommen und auf das SDS-PA-Gel aufgetragen. Zur Detektion wurde der Antikörper gegen HvWHIRLY1 eingesetzt. Als Beladungskontrolle wurde der obere Teil des SDS-PA-Gels mit Coomassie-Brilliantblau gefärbt, während der untere Teil für den Western Blot verwendet wurde. WHIRLY1 = Bakterienlysate, in denen die WHIRLY1-Sequenz der Gerste überexprimiert wurde, pASK-IBA3 = Lysate der Zellen, die den Leervektor pASK-IBA3 enthielten, nach Zugabe von 0,2 μ M Anhydrotetracyclin.

Zur Überprüfung, ob das reduzierte Zellwachstum der *HvWHIRLY1*-überexprimierenden Zellen mit einer veränderten Kompaktierung der Nukleole einhergeht, wurden die bakteriellen Nukleole mit dem DNA-spezifischen Fluoreszenzfarbstoff DAPI angefärbt (2.3.3.8). *E. coli*-Zellen, die *HvWHIRLY1* überexprimieren (*HvWHY1* +A), zeigen stark kondensierte Nukleole, die als ein bzw. zwei punktförmige Strukturen in der Zelle sichtbar sind (Abb. 14, oben). In Kontrollzellen, in denen die *HvWHIRLY1*-Expression nicht induziert worden ist (*HvWHY1* -A) oder die den Leervektor pASK-IBA3 enthalten (pASK-IBA3 +A bzw. -A), liegt die DNA hingegen in der gesamten Zelle verteilt vor. Mittels Phasenkontrastmikroskopie wird die Lage der bakteriellen Zellen dokumentiert, wobei das Cytoplasma als dunkler Bereich im Zellinneren zu erkennen ist (Abb. 14, unten).

Aus dem Wachstumsversuch und der mikroskopischen Untersuchung wird ersichtlich, dass der Verpackungsgrad der Nukleole direkt mit dem Wachstum der *E. coli*-Zellen zusammenhängt, wie bereits in einer früheren Studie gezeigt werden konnte (Melonek et al. 2012). Eine verstärkte Kompaktierung der Nukleole führt zu einem reduzierten Zellwachstum. Der zuvor in Gerstenchloroplasten zu beobachtende Effekt von HvWHIRLY1 auf die Kompaktierung der Nukleole kann mit Hilfe der heterologen Expressionsstudie in *E. coli* bestätigt werden. Während eine Überexpression des *HvWHIRLY1*-Gens in *E. coli* zu einer stärkeren Kompaktierung der Nukleole führt, bewirkt der RNAi-erzeugte *knock-down* von WHIRLY1 in der Gerste eine reduzierte Verpackung der plastidären Nukleole.

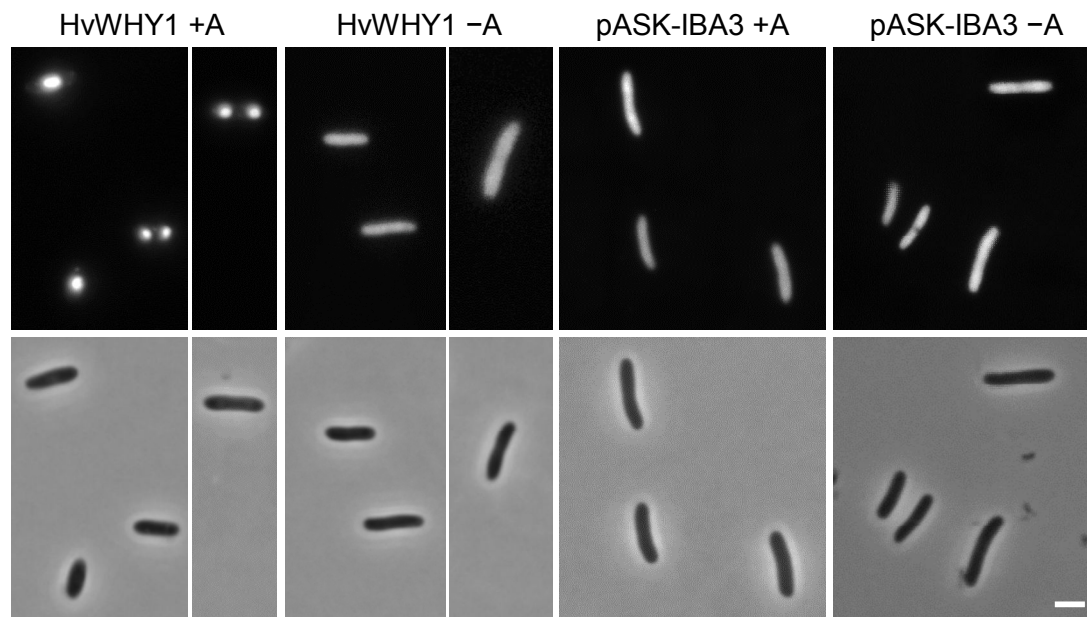


Abb. 14: Visualisierung bakterieller Nukleotide nach Überexpression des rekombinanten *WHIRLY1*-Gens der Gerste.

Die Färbung der bakteriellen Nukleotide erfolgte zwei Stunden nach der Induktion der Überexpression mit 1 µg/ml DAPI. Die obere Reihe zeigt die mittels DAPI angefärbte DNA. In der unteren Reihe sind die zugehörigen Phasenkontrastaufnahmen der *E. coli*-Zellen dargestellt. HvWHY1 = Zellen mit dem Konstrukt pASK-IBA3/HvWHY1, pASK-IBA3 = Zellen, die den Leervektor enthalten, +A = *E. coli*-Zellen nach Induktion mit 0,2 µM Anhydrotetracyclin, -A = *E. coli*-Zellen ohne Induktion, Messbalken = 2 µm.

In Anbetracht der Beobachtung, dass das WHIRLY1-Protein der Gerste nicht nur die Kompaktierung von plastidären Nukleoiden in der Gerste, sondern auch von bakteriellen Nukleoiden beeinflussen und verändern kann, wurde untersucht, ob HvWHIRLY1 die Funktion bakterieller NAPs ersetzen kann. Dazu wurden Komplementationsversuche mit *E. coli* Mutanten für die Proteine H-NS und HU durchgeführt (2.3.3.9). Die HU-Mutante *hupA/B* wurde ausgewählt, da das HU-Protein wie WHIRLY1-Proteine sowohl an einzel- als auch an doppelsträngige DNA sowie an RNA binden kann, wobei die Bindung an DNA unabhängig von der Sequenz erfolgt (Berthold & Geider 1976; Kamashev et al. 1999). Bei HU handelt es sich um eines der abundantesten NAPs in *E. coli*, das abhängig von der Wachstumsphase als Homo- oder Heterodimer vorkommt (Claret & Rouvière-Yaniv 1997; Azam et al. 1999). Es hat sowohl einen Einfluss auf die Struktur der Nukleotide als auch auf die Genexpression (Broyles & Pettijohn 1986; Oberto et al. 2009). Daneben wurde die *hns*-Mutante für Komplementationsversuche herangezogen, da für H-NS gezeigt wurde, dass es einen ähnlichen Effekt auf das Zellwachstum und die Kompaktierung der Nukleotide hat wie eine Überexpression des *HvWHIRLY1*-Gens in *E. coli* (Spassky et al. 1984; Spurio et al. 1992). H-NS bindet sowohl DNA als auch RNA und verändert die Struktur der Nukleotide durch die Ausbildung von DNA-H-NS-DNA-Brücken (Brescia et al. 2004; Noom et al. 2007). Die Komplementationsversuche zeigen allerdings, dass HvWHIRLY1 weder die Funktion von

HU noch die Funktion von H-NS ersetzen kann (Anhang, Abb. 55 und Abb. 56). HvWHIRLY1 verfügt somit über keine analoge Funktion für diese beiden NAPs.

3.2.2 Bedeutung des Nukleinsäure-Bindemotivs von HvWHIRLY1 für die Kompaktierung bakterieller Nukleoide

Innerhalb der WHIRLY-Domäne befindet sich ein hoch konserviertes Nukleinsäure-Bindemotiv mit der Aminosäureabfolge KGKAAL, mit dem WHIRLY-Proteine an einzelsträngige DNA binden können (Desveaux et al. 2002). Das zweite Lysin innerhalb dieses Motivs (K97 im WHIRLY1-Protein der Gerste) ist zudem für die Oligomerisierung von WHIRLY-Tetrameren zu einem 24-mer nötig (Cappadocia et al. 2012). Um zu klären, ob das Nukleinsäure-Bindemotiv oder das 24-mer die Kompaktierung der Nukleoide vermittelt, wurde mittels ortsspezifischer Mutagenese (2.3.8) das gesamte Nukleinsäure-Bindemotiv deletiert (HvWHIRLY1 Δ DBM; Δ DBM) bzw. das Lysin an Position 97 gegen ein Alanin substituiert (HvWHIRLY1K97A; K97A). Für einen Wachstumsversuch wurden die mutierten HvWHIRLY1-Sequenzen in *E. coli* überexprimiert (Abb. 15).

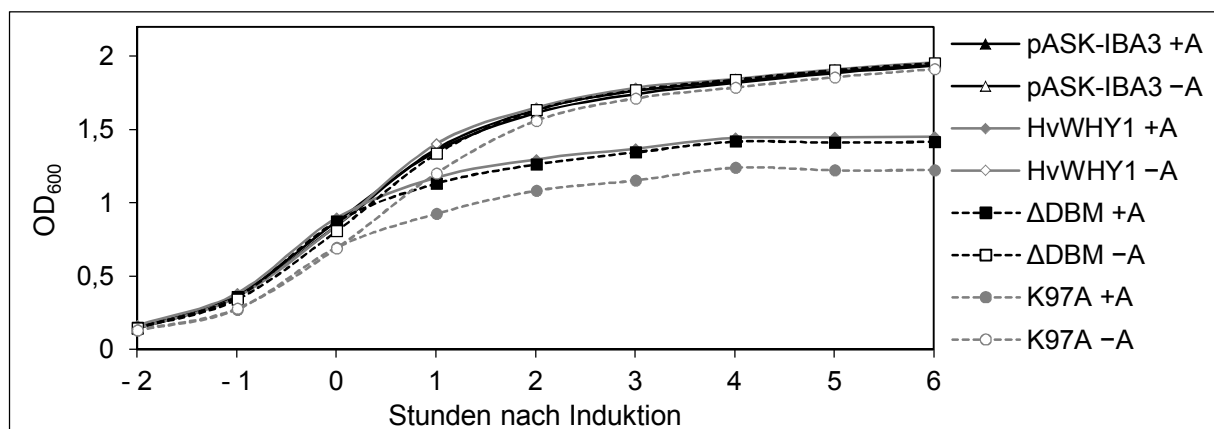


Abb. 15: Zellwachstum von *E. coli* nach heterologer Überexpression der HvWHIRLY1 Δ DBM- bzw. HvWHIRLY1K97A-Sequenz.

Für die Überexpression wurden die Konstrukte pASK-IBA3/HvWHY1 Δ DBM bzw. pASK-IBA3/HvWHY1K97A verwendet. Die Induktion der Überexpression erfolgte zum Zeitpunkt „0“ mit 0,2 μ M Anhydrotetracyclin. Δ DBM = Deletion des Nukleinsäure-Bindemotivs (KGKAAL), K97A = Austausch des Lysins an Position 97 durch ein Alanin, +A = Induktion mit 0,2 μ M Anhydrotetracyclin, -A = keine Induktion, OD₆₀₀ = optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm.

Wie bei der Überexpression von HvWHIRLY1 ist nach Induktion der Expression von HvWHIRLY1 Δ DBM (Δ DBM +A) bzw. HvWHIRLY1K97A (K97A +A) ein reduziertes Wachstum zu allen Messzeitpunkten nach der Induktion zu verzeichnen. Der Unterschied in der optischen Dichte von Zellen nach Expression von HvWHIRLY1K97A im Vergleich zu Zellen nach Expression von HvWHIRLY1 bzw. HvWHIRLY1 Δ DBM ist mit der geringeren

Zelldichte von *HvWHIRLY1K97A* zum Zeitpunkt der Induktion zu erklären. Das Wachstum der Zellen nach Überexpression von *HvWHIRLY1K97A* unterscheidet sich ansonsten nicht vom Wachstum der Zellen, die *HvWHIRLY1* bzw. *HvWHIRLY1ΔDBM* exprimieren. Die Akkumulation der rekombinanten *HvWHIRLY1*-Proteine konnte immunologisch bestätigt werden (Anhang, Abb. 57). Neben dem reduzierten Zellwachstum konnte außerdem eine starke Kompaktierung der Nukleole nach Expression von *HvWHIRLY1ΔDBM* bzw. *HvWHIRLY1K97A* beobachtet werden (Abb. 16). Trotz der beiden Mutationen ist das *HvWHIRLY1*-Protein immer noch in der Lage die bakteriellen Nukleole zu kompaktieren. Aus diesem Grund kann eine Beteiligung des Nukleinsäure-Bindemotivs sowie des Lysins 97 an der Kompaktierung der Nukleole ausgeschlossen werden.

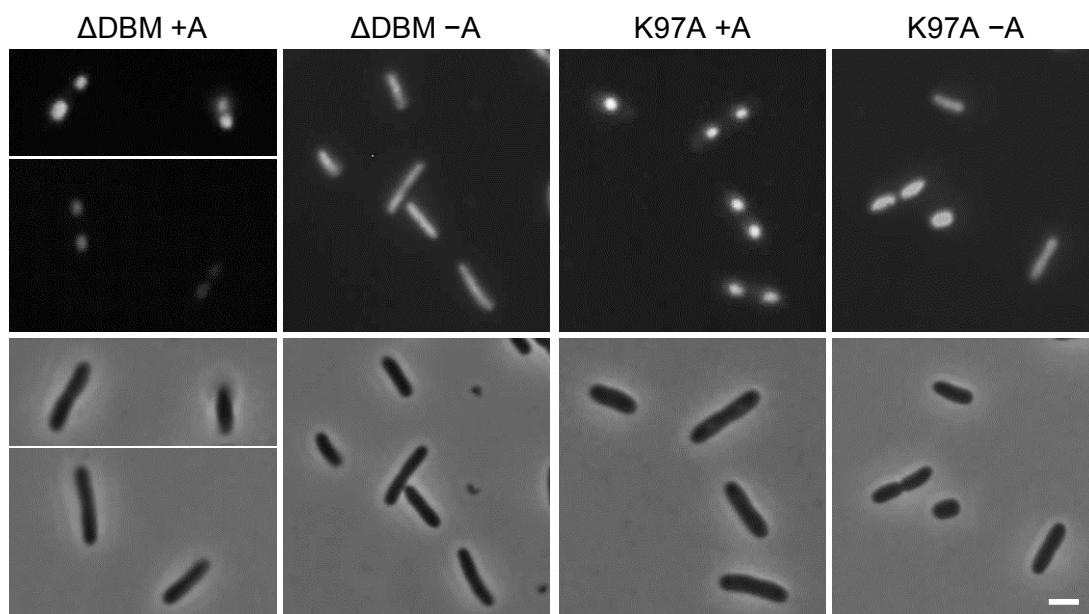


Abb. 16: Visualisierung bakterieller Nukleole nach Überexpression der *HvWHIRLY1ΔDBM*- bzw. *HvWHIRLY1K97A*-Sequenz.

Die Färbung der bakteriellen Nukleole erfolgte zwei Stunden nach der Induktion der Überexpression mit 1 µg/ml DAPI. Die obere Reihe zeigt die mittels DAPI angefärbte DNA. In der unteren Reihe sind die zugehörigen Phasenkontrastaufnahmen der *E. coli*-Zellen dargestellt. ΔDBM = Deletion des Nukleinsäure-Bindemotivs (KGKAAL), K97A = Austausch des Lysins an Position 97 durch ein Alanin, +A = *E. coli*-Zellen nach Induktion mit 0,2 µM Anhydrotetracyclin, -A = *E. coli*-Zellen ohne Induktion, Messbalken = 2 µm.

3.2.3 Bedeutung von konservierten Sequenzmotiven der WHIRLY-Proteine für die Kompaktierung bakterieller Nukleole durch *HvWHIRLY1*

Da das Nukleinsäure-Bindemotiv als charakteristisches Merkmal für die WHIRLY-Proteine nicht an der Kompaktierung der Nukleole beteiligt zu sein scheint, wurde ein Sequenzvergleich mit der Aminosäuresequenz ausgewählter plastidär lokalisierter WHIRLY1- und WHIRLY3-Proteine durchgeführt (Abb. 17).

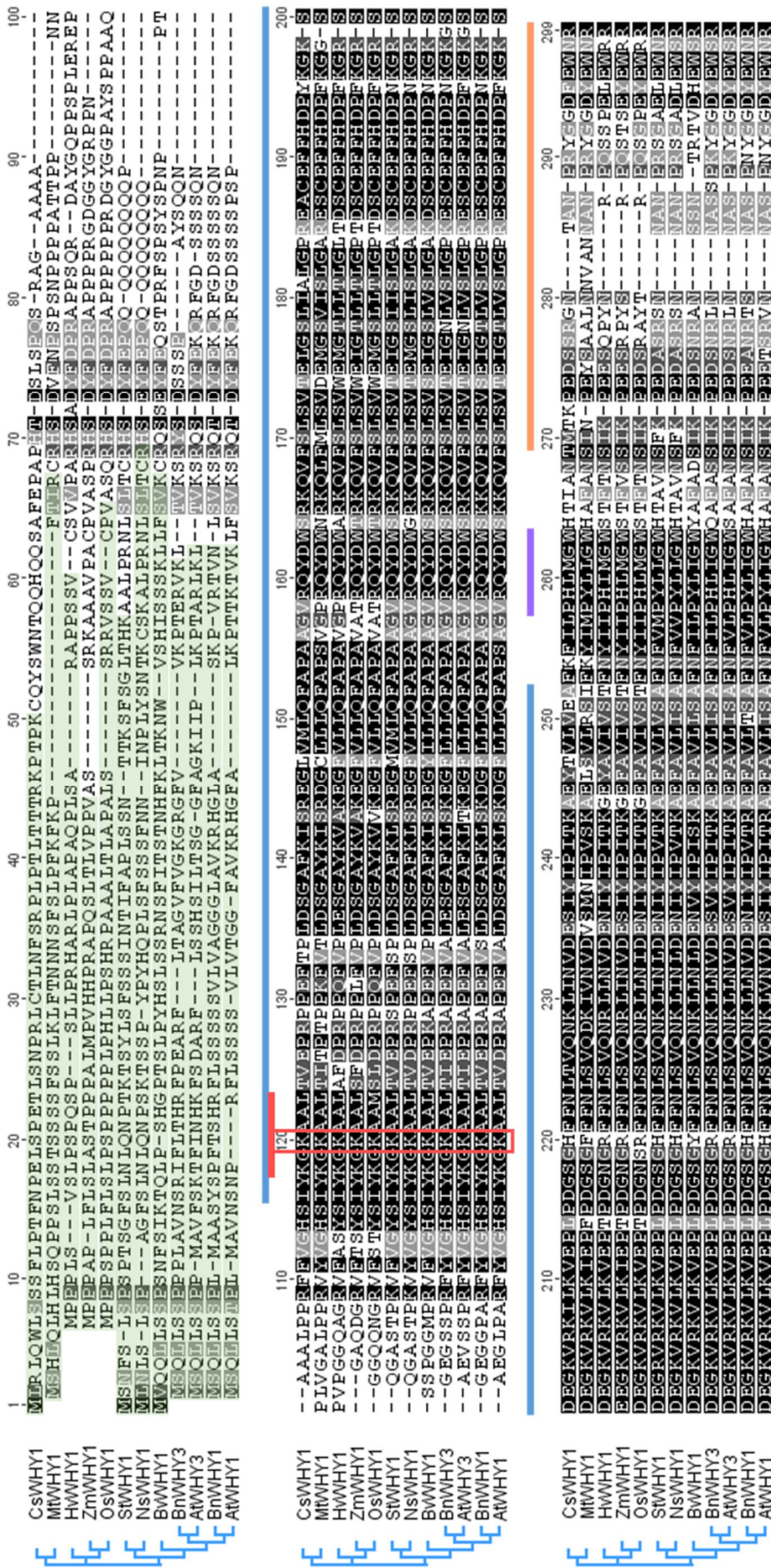


Abb. 17: Vergleich der Aminosäuresequenzen ausgewählter plastidärer WHIRLY-Proteine.

Der Sequenzvergleich mit integriertem Stammbaum wurde mit Geneious 8.1.6 (ClustalW) erstellt. Konservierte Aminosäuren sind schwarz (100 % Ähnlichkeit), dunkelgrau (80–100 % Ähnlichkeit) bzw. hellgrau (60–80 % Ähnlichkeit) unterlegt. Die folgenden Proteinsequenzen wurden für den Vergleich verwendet (Name, Organismus, GenBank Accessionnummer): CsWHY1, *Cucumis sativus*, XP_004167189; MwWHY1, *Medicago truncatula*, KEH19793; HvWHY1, *Hordeum vulgare*, BAJ96655; ZmWHY1, *Zea mays*, NP_001123589; OsWHY1, *Oryza sativa*, BAD68418; StWHY1, *Solanum tuberosum*, NP_001275155; NsWHY1, *Nicotiana sylvestris*, XP_009758353; BmWHY1, *Beta vulgaris*, XP_010683246; BnWHY3, *Brassica napus*, CDY45200; AtWHY3, *Arabidopsis thaliana*, NP_178377; BnWHY1, *Brassica napus*, CDY66532; AtWHY1, *Arabidopsis thaliana*, NP_172893. Grün unterlegt = mit TargetP vorhergesagte plastidäre Transitsequenz, blau = WHIRLY-Domäne, rot = Nukleinsäure-Bindemotiv (KGKAAAL) und das zweite Lysin innerhalb des Nukleinsäure-Bindemotivs, violett = vorhergesagtes Kupferbindemotiv (CBM), orange = vorhergesagte Autoregulationsdomäne (PAD).

Mit Hilfe des Sequenzvergleichs sollten weitere konservierte Sequenzmotive innerhalb der WHIRLY-Proteine identifiziert werden, die die Kompaktierung der Nukleotide vermitteln könnten. Die am N-Terminus gelegene Transitsequenz, die von dem Programm TargetP vorhergesagt wird, ist grün unterlegt. Die Transitsequenz wurde für die heterologen Expressionsstudien entfernt, da eukaryotische Proteine in *E. coli* nicht korrekt prozessiert werden können und die Expression durch eine Transitsequenz negativ beeinflusst werden kann. Der blaue Balken markiert die konservierte WHIRLY-Domäne, in der das Nukleinsäure-Bindemotiv und das zweite Lysin innerhalb dieses Sequenzmotivs rot hervorgehoben sind, für die eine Beteiligung an der Kompaktierung bereits ausgeschlossen werden konnte (3.2.2). Daneben befindet sich am C-Terminus eine vorhergesagte Autoregulationsdomäne (orange), die erstmals von Desveaux et al. (2005) beschrieben wurde. Des Weiteren wird für einige WHIRLY-Proteine, wie zum Beispiel WHIRLY1 der Gerste oder WHIRLY3 von Arabidopsis, ein Kupferbindemotiv am C-Terminus hinter der WHIRLY-Domäne vorhergesagt, welches violett markiert ist (Isemer 2013). Dem Histidin innerhalb des Kupferbindemotivs kommt dabei eine besondere Stellung zu, da vier Histidine für die Bindung von Kupfer benötigt werden (Viles et al. 1999).

Um zu prüfen, ob die vorhergesagte Autoregulationsdomäne oder das Kupferbindemotiv an der Kompaktierung beteiligt sind, erfolgten Wachstumsversuche mit *HvWHIRLY1*-Sequenzen, die innerhalb der Autoregulationsdomäne (*HvWHIRLY1* Δ PAD; Δ PAD) bzw. im Kupferbindemotiv deletiert sind (*HvWHIRLY1* Δ CBM; Δ CBM) (Abb. 18). Nach Expression von *HvWHIRLY1* Δ PAD (Δ PAD +A) bzw. *HvWHIRLY1* Δ CBM (Δ CBM +A) ist nach wie vor ein reduziertes Zellwachstum messbar, was zeigt, dass auch diese beiden vorhergesagten Sequenzmotive nicht an der Verpackung der Nukleotide involviert sind. Auf eine Anfärbung der Nukleotide wurde hier verzichtet, da zuvor gezeigt werden konnte, dass die Kompaktierung der Nukleotide mit dem reduzierten Zellwachstum einhergeht. Der immunologische Nachweis der rekombinanten Proteine ist dem Anhang zu entnehmen (Abb. 58 und Abb. 59).

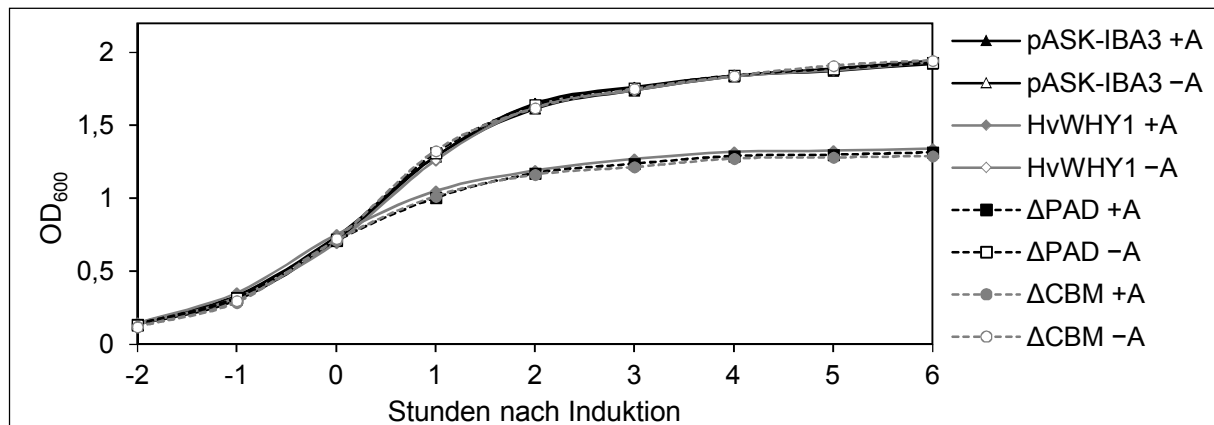


Abb. 18: Zellwachstum von *E. coli* nach heterologer Überexpression der *HvWHIRLY1ΔPAD*- bzw. *HvWHIRLY1ΔCBM*-Sequenz.

Für die Überexpression wurden die Konstrukte pASK-IBA3/*HvWHY1ΔPAD* bzw. pASK-IBA3/*HvWHY1ΔCBM* verwendet. Die Induktion der Überexpression erfolgte zum Zeitpunkt „0“ mit 0,2 μM Anhydrotetracyclin. ΔPAD = Deletion der vorhergesagten Autoregulationsdomäne (PAD; IKPEESQPYNRPQSSPELEWRR), ΔCBM = Deletion des vorhergesagten Kupferbindemotivs (CBM; PHIMGW). +A = Induktion mit 0,2 μM Anhydrotetracyclin, -A = keine Induktion, OD₆₀₀ = optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm.

3.2.4 Einfluss der plastidären WHIRLY-Proteine von Arabidopsis und Mais auf die Kompaktierung bakterieller Nukleole

Nachdem die Mutationen bzw. Deletionen der konservierten Aminosäuren und Sequenzmotive nicht klären konnten, wie *HvWHIRLY1* die Nukleoidkompaktierung vermittelt, wurde als nächstes der Einfluss von plastidär lokalisierten WHIRLY-Proteinen aus anderen Arten auf die Nukleole in *E. coli* überprüft. Zuerst wurden dazu die Sequenzen der plastidären WHIRLY-Proteine von Arabidopsis, *AtWHIRLY1* und *AtWHIRLY3*, näher untersucht. Ein Aminosäuresequenzvergleich zeigt, dass *HvWHIRLY1* und *AtWHIRLY1* bzw. *AtWHIRLY3* zu 52,4 % bzw. 52,6 % aus identischen und zu weiteren 31,5 % bzw. 28,4 % aus ähnlichen Aminosäuren bestehen (Anhang, Abb. 60 und Abb. 61).

Die Wachstumskurven der Zellen nach Induktion der Expression von *AtWHIRLY1* (*AtWHY1* +A) bzw. *AtWHIRLY3* (*AtWHY3* +A) zeigen im Unterschied zu Zellen, die *HvWHIRLY1* (*HvWHY1* +A) überexprimieren, kein reduziertes Zellwachstum (Abb. 19). Zudem ist nach Färbung mit DAPI keine kompaktierende Wirkung von *AtWHIRLY1* bzw. *AtWHIRLY3* auf die bakteriellen Nukleole zu beobachten (Abb. 20). Die Nukleole sind trotz Akkumulation des rekombinanten *AtWHIRLY1*- bzw. *AtWHIRLY3*-Proteins, die immunologisch bestätigt wurde (Anhang, Abb. 62), entfaltet und wie in den Kontrollzellen über die gesamte Bakterienzelle verteilt. Im Unterschied zum WHIRLY1-Protein der Gerste scheint weder das WHIRLY1- noch das WHIRLY3-Protein von Arabidopsis einen Effekt auf die Verpackung der Nukleole zu haben.

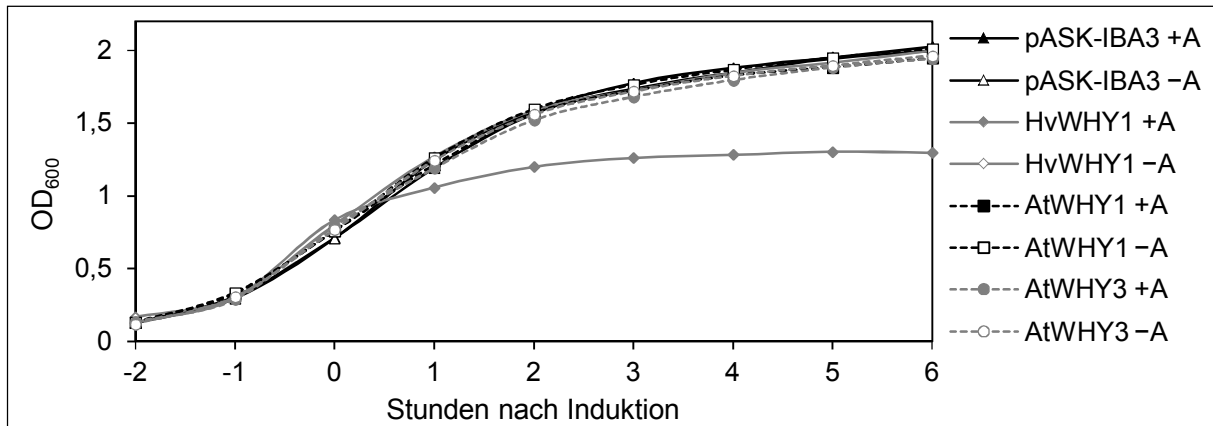


Abb. 19: Zellwachstum von *E. coli* nach heterologer Überexpression der *WHIRLY1*- bzw. *WHIRLY3*-Sequenz von *Arabidopsis* im Vergleich zur *WHIRLY1*-Sequenz der Gerste.

Für die Überexpression wurden die Konstrukte pASK-IBA3/HvWHY1 (HvWHY1), pASK-IBA3/AtWHY1 (AtWHY1) bzw. pASK-IBA3/AtWHY3 (AtWHY3) verwendet. In den drei Konstrukten ist die kodierende Sequenz für das jeweilige reife WHIRLY-Protein am 3'-Ende mit der Sequenz eines Strep-Tags fusioniert. Die Induktion der Überexpression erfolgte zum Zeitpunkt „0“ mit 0,2 μ M Anhydrotetracyclin. +A = Induktion mit 0,2 μ M Anhydrotetracyclin, -A = keine Induktion, OD₆₀₀ = optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm.

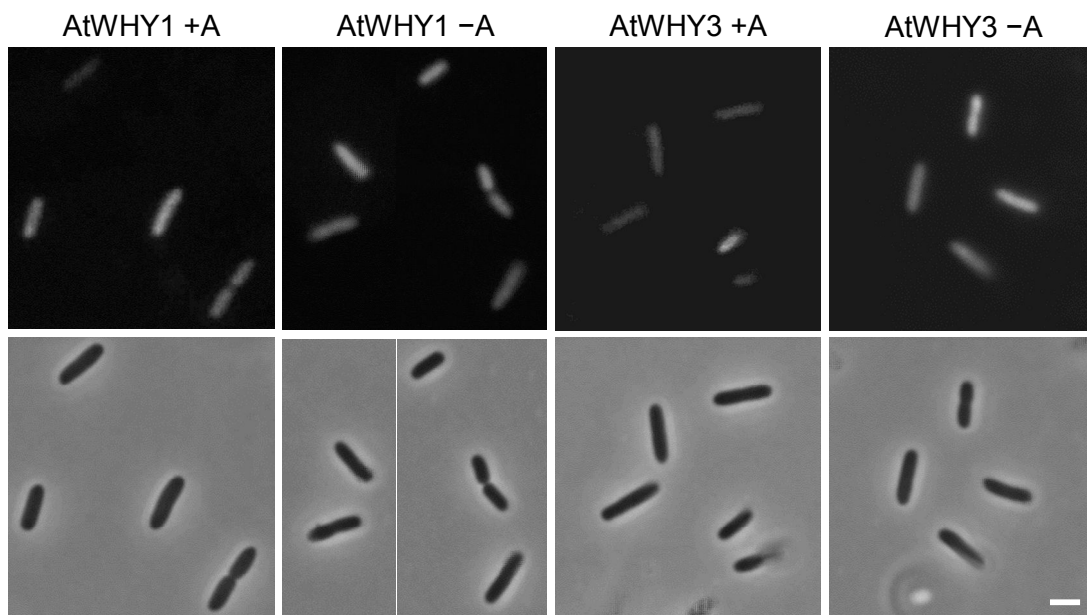


Abb. 20: Visualisierung bakterieller Nukleotide nach Überexpression der *WHIRLY1*- bzw. *WHIRLY3*-Sequenz von *Arabidopsis*.

Die Färbung der bakteriellen Nukleotide erfolgte zwei Stunden nach der Induktion der Überexpression mit 1 μ g/ml DAPI. Die obere Reihe zeigt die mittels DAPI angefärbte DNA. In der unteren Reihe sind die zugehörigen Phasenkontrastaufnahmen der *E. coli*-Zellen dargestellt. +A = *E. coli*-Zellen nach Induktion mit 0,2 μ M Anhydrotetracyclin, -A = *E. coli*-Zellen ohne Induktion, Messbalken = 2 μ m.

Um zu prüfen, ob neben dem WHIRLY1-Protein der Gerste noch weitere WHIRLY1-Proteine von monokotylen Pflanzen die Nukleoidkompaktierung beeinflussen können, wurde das WHIRLY1-Protein des Mais (ZmWHIRLY1; ZmWHY1) zur Überexpression in *E. coli* ausgewählt. Das WHIRLY1-Protein der Gerste zeigt eine größere Sequenzhomologie zu

monokotylen WHIRLY-Proteinen wie ZmWHIRLY1 als zu WHIRLY-Proteinen von dikotylen Pflanzen wie z. B. Arabidopsis. So bestehen HvWHIRLY1 und ZmWHIRLY1 zu 75,2 % aus identischen und zu 16,5 % aus ähnlichen Aminosäuren, was eine ähnliche Funktion der beiden Proteine sehr wahrscheinlich macht (Anhang, Abb. 63). Nach Induktion der Überexpression von *ZmWHIRLY1* (*ZmWHY1* +A) kann eine Reduktion des Zellwachstums in *E. coli* beobachtet werden (Abb. 21). Damit hat das ZmWHIRLY1-Protein den gleichen Effekt auf das Wachstum der bakteriellen Zellen wie HvWHIRLY1, wobei das Zellwachstum durch die Expression von *ZmWHIRLY1* noch stärker reduziert wird als von *HvWHIRLY1*. Im Anhang ist ein Western Blot dargestellt, der die Akkumulation des rekombinanten ZmWHIRLY1-Proteins in *E. coli* unter Verwendung des α -ZmWHIRLY1-Antikörpers zeigt (Anhang, Abb. 64). Wie zuvor für HvWHIRLY1 beobachtet werden konnte, kommt es einhergehend mit dem reduzierten Zellwachstum nach Akkumulation des ZmWHIRLY1-Proteins zu einer verstärkten Kompaktierung der bakteriellen Nukleole. Zudem weisen die Bakterienzellen zwei Stunden nach Induktion der *ZmWHIRLY1*-Expression (*ZmWHY1* +A) ein bis zwei kleine punktförmige Nukleole pro Bakterienzelle auf (Abb. 22). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die beiden WHIRLY1-Proteine der monokotylen Pflanzen einen ähnlichen Einfluss auf die Nukleoidstruktur haben.

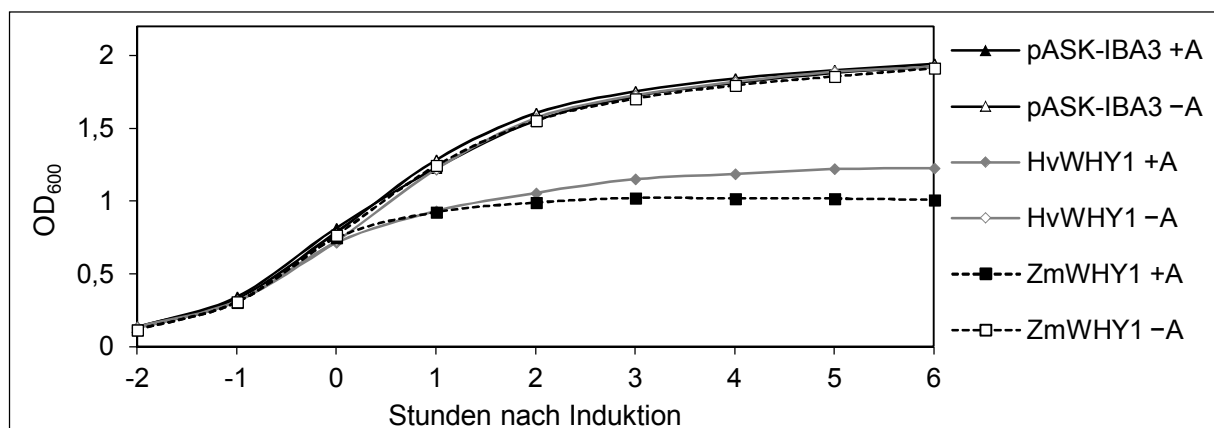


Abb. 21: Zellwachstum von *E. coli* nach heterologer Überexpression der WHIRLY1-Sequenz des Mais im Vergleich zur WHIRLY1-Sequenz der Gerste.

Für die Überexpression wurden die Konstrukte pASK-IBA3/HvWHY1 (HvWHY1) bzw. pASK-IBA3/ZmWHY1 (ZmWHY1) verwendet. In den drei Konstrukten ist die kodierende Sequenz für das jeweilige reife WHIRLY-Protein am 3'-Ende mit der Sequenz eines Strep-Tags fusioniert. Die Induktion der Überexpression erfolgte zum Zeitpunkt „0“ mit 0,2 μ M Anhydrotetracyclin. +A = Induktion mit 0,2 μ M Anhydrotetracyclin, -A = keine Induktion, OD₆₀₀ = optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm.

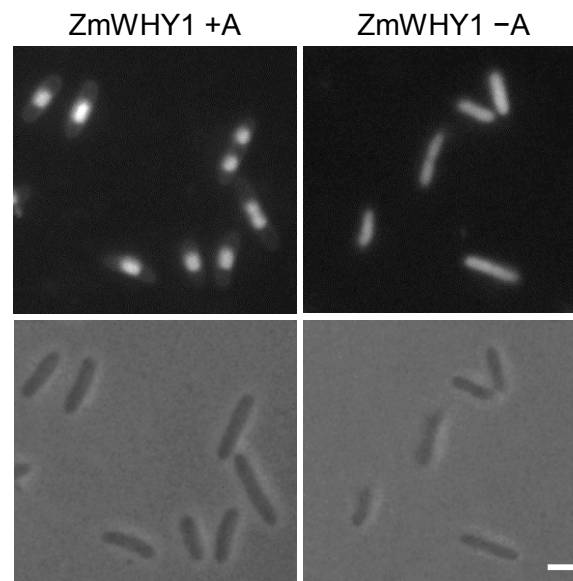


Abb. 22: Visualisierung bakterieller Nukleotide nach Überexpression der WHIRLY1-Sequenz des Mais.

Die Färbung der bakteriellen Nukleotide erfolgte zwei Stunden nach der Induktion der Überexpression mit 1 µg/ml DAPI. Die obere Reihe zeigt die mittels DAPI angefärbte DNA. In der unteren Reihe sind die zugehörigen Phasenkontrastaufnahmen der *E. coli*-Zellen dargestellt. +A = *E. coli*-Zellen nach Induktion mit 0,2 µM Anhydrotetracyclin, -A = *E. coli*-Zellen ohne Induktion, Messbalken = 2 µm.

3.2.5 Bedeutung des N-Terminus von HvWHIRLY1 für die Kompaktierung von Nukleoiden

Die oben beschriebenen Ergebnisse haben gezeigt, dass die konservierten Motive der WHIRLY-Proteine, die auch in den WHIRLY-Proteinen von Arabidopsis vorhanden sind, keinen Einfluss auf die Kompaktierung bakterieller Nukleotide haben (siehe 3.2.2 und 3.2.3). Durch die Deletion des vorhergesagten Kupferbindemotivs und der Autoregulationsdomäne wurde ein Großteil des C-Terminus des HvWHIRLY1-Proteins mutiert. Daher ist der C-terminale Bereich wahrscheinlich nicht für die Kompaktierung der bakteriellen Nukleotide zuständig. Durch die Überexpression der beiden plastidären WHIRLY-Proteine von Arabidopsis kann zudem eine Beteiligung der WHIRLY-Domäne an der Kompaktierung der Nukleotide ausgeschlossen werden (siehe 3.2.4), da die WHIRLY-Domäne von HvWHIRLY1 und AtWHIRLY1 bzw. AtWHIRLY3 zu 73,1 % bzw. 76,5 % aus identischen und zu 23,1 % bzw. 19,9 % aus ähnlichen Aminosäuren besteht (siehe hierzu im Anhang Abb. 60, Abb. 61 und Abb. 63). Da weder der C-Terminus noch die WHIRLY-Domäne an der Kompaktierung der Nukleotide beteiligt zu sein scheint, ist zu vermuten, dass sich die Sequenz, welche die Kompaktierung bewirkt, am N-Terminus der WHIRLY1-Proteine von Gerste und Mais befindet. Deshalb wurde zunächst der N-Terminus des WHIRLY1-Proteins der Gerste von Aminosäure 42 bis 73 deletiert (HvWHIRLY1 Δ 42–73; Δ 42–73). Nach Induktion der Überexpression der HvWHIRLY1 Δ 42–73-Sequenz, kann ein Zellwachstum beobachtet werden, das dem der Kontrollzellen, die kein HvWHIRLY1 exprimieren, gleicht (Abb. 23).

Darüber hinaus bestätigt die Färbung der bakteriellen Nukleoide, dass der Effekt von HvWHIRLY1 auf die Kompaktierung durch Deletion des N-Terminus aufgehoben wird. So liegt das Nukleoid nach Expression von *HvWHIRLY1* Δ 42–73 (Δ 42–73 +A) über das gesamte Zellinnere entpackt vor wie in den Zellen, in denen die Expression nicht induziert worden ist (Δ 42–73 –A) (Abb. 24). Die Akkumulation des deletierten Proteins wurde immunologisch nachgewiesen und ist dem Anhang zu entnehmen (Abb. 65). Die Deletion der Aminosäuren 42 bis 73 zeigt, dass der N-Terminus von HvWHIRLY1 für die Kompaktierung der Nukleoide verantwortlich ist.

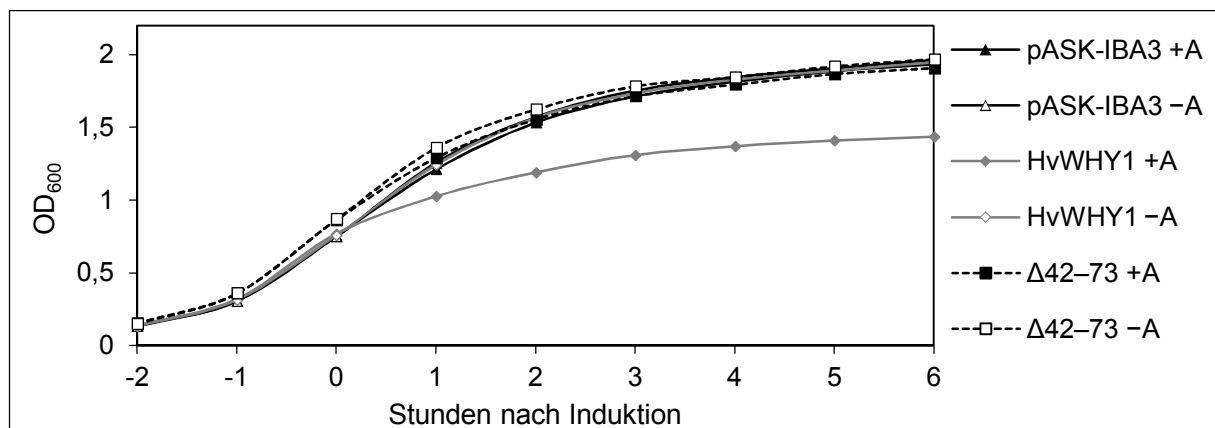


Abb. 23: Zellwachstum von *E. coli* nach heterologer Überexpression der am 5'-Ende deletierten *HvWHIRLY1* Δ 42-73-Sequenz.

Für die Überexpression wurde das Konstrukt pASK-IBA3/*HvWHY1* Δ 42–73 verwendet. Die Induktion der Überexpression erfolgte zum Zeitpunkt „0“ mit 0,2 μ M Anhydrotetracyclin. Δ 42–73 = Deletion der Aminosäuren 42 bis 73 (CSVVPARHSADYFDPRAPPSQRDAYGQPPSPL), +A = Induktion mit 0,2 μ M Anhydrotetracyclin, –A = keine Induktion, OD₆₀₀ = optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm.

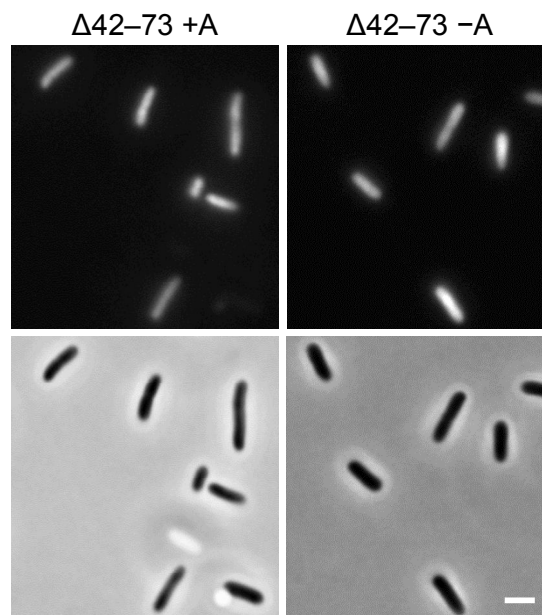


Abb. 24: Visualisierung bakterieller Nukleotide nach Überexpression der *HvWHIRLY1*Δ42-73-Sequenz.

Die Färbung der bakteriellen Nukleotide erfolgte zwei Stunden nach der Induktion der Überexpression mit 1 µg/ml DAPI. Die obere Reihe zeigt die mittels DAPI angefärbte DNA. In der unteren Reihe sind die zugehörigen Phasenkontrastaufnahmen dargestellt. Δ42-73 = Deletion der Aminosäuren 42 bis 73 (CSVVPARHSADYFDPRAPPSQRDAYGQPPSPL), +A = *E. coli*-Zellen nach Induktion mit 0,2 µM Anhydrotetracyclin, -A = *E. coli*-Zellen ohne Induktion, Messbalken = 2 µm.

Um den Bereich am N-Terminus, der die Nukleoidkompaktierung bewirkt, weiter einzugrenzen, wurde der Aminosäurebereich 42 bis 73 in zwei Teile unterteilt. So wurden zum einen die Aminosäuren 42 bis 60 (*HvWHIRLY1*Δ42-60; Δ42-60; CSVVPARHSADYFDPRAPP) und zum anderen die Aminosäuren 61 bis 73 (*HvWHIRLY1*Δ61-73; Δ61-73; SQRDAYGQPPSPL) innerhalb der *HvWHIRLY1*-Sequenz deletiert. Diese deletierten Sequenzen wurden erneut in den Bakterien exprimiert. Zellen, die *HvWHIRLY1*Δ42-60 (Δ42-60 +A) überexprimieren, zeigen ein Zellwachstum wie es nach Expression von *HvWHIRLY1*Δ42-73 (Δ42-73 +A) und für die Kontrollzellen zu beobachten ist (Abb. 25). Nach Induktion der Expression von *HvWHIRLY1*Δ61-73 (Δ61-73 +A) ist hingegen ein reduziertes Zellwachstum wie nach Expression von *HvWHIRLY1* messbar. Das für die Kompaktierung der Nukleotide zuständige Motiv befindet sich demnach im Bereich von Aminosäure 42 bis 60.

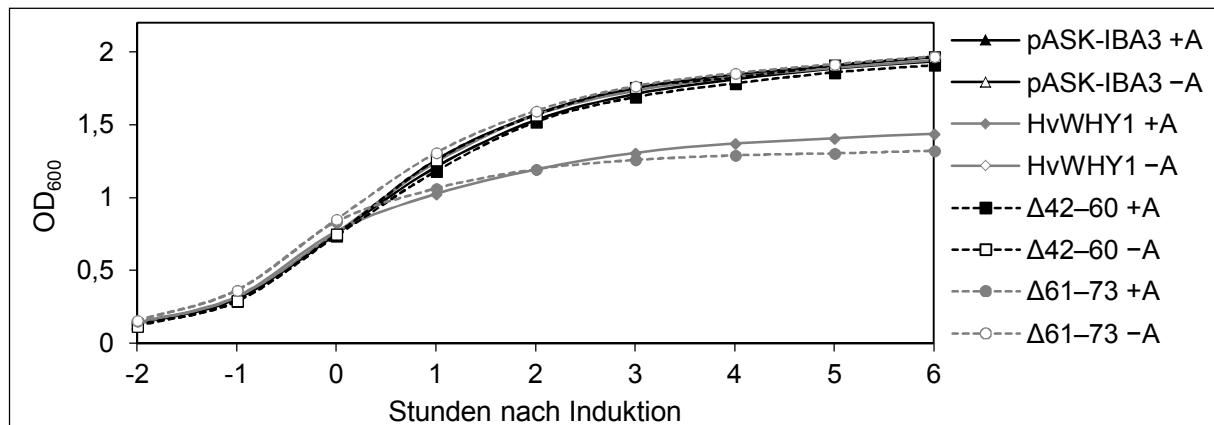


Abb. 25: Zellwachstum von *E. coli* nach heterologer Überexpression der *HvWHIRLY1*Δ42-60- bzw. *HvWHIRLY1*Δ61-73-Sequenz.

Für die Überexpression wurden die Konstrukte pASK-IBA3/*HvWHY1*Δ42-60 und pASK-IBA3/*HvWHY1*Δ61-73 verwendet. Die Induktion der Überexpression erfolgte zum Zeitpunkt „0“ mit 0,2 μM Anhydrotetracyclin. Δ42-60 = Deletion der Aminosäuren 42 bis 60 (CSVVPARHSADYFDPRAPP), Δ61-73 = Deletion der Aminosäuren 61 bis 73 (SQRDAYGQPPSPL), +A = Induktion mit 0,2 μM Anhydrotetracyclin, -A = keine Induktion, OD₆₀₀ = optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm.

3.2.6 Analyse des N-Terminus von *HvWHIRLY1* zur Identifizierung des für die Kompaktierung wichtigen Bereichs

Zur weiteren Eingrenzung des für die Kompaktierung der Nukleotide nötigen Bereichs, wurde ein Aminosäuresequenzvergleich mit *WHIRLY1*-Proteinen aus monokotylen Pflanzenarten der Familie der Poaceae (Süßgräser) durchgeführt, um den N-Terminus auf konservierte Bereiche hin zu untersuchen, die möglicherweise an der Funktion beteiligt sein könnten (Abb. 26). Der Sequenzvergleich zeigt einen konservierten Bereich an Position 58 bis 72 (roter Kasten in Abb. 26). Dieser Bereich ist mit Ausnahme des *WHIRLY1*-Proteins aus *Oryza brachyantha*, welchem ein Großteil des N-Terminus fehlt, mit geringfügigen Abweichungen in allen für den Vergleich herangezogenen monokotylen *WHIRLY1*-Proteinen zu finden.



Abb. 26: Vergleich der Aminosäuresequenzen von monokotylen WHIRLY1-Proteinen aus der Familie der Poaceae.

Der Sequenzvergleich mit integriertem Stammbaum wurde mit Geneious 8.1.6 (ClustalW) erstellt. Konservierte Aminosäuren sind schwarz (100 % Ähnlichkeit), dunkelgrau (80–100 % Ähnlichkeit) bzw. hellgrau (60–80 % Ähnlichkeit) unterlegt. Die folgenden Proteinsequenzen wurden für den Vergleich verwendet (Name, Organismus, GenBank Accessionnummer): OsWHY1, *Oryza sativa*, BAD68418; ObWHY1, *Oryza brachyantha*, XP_006656631; HWHY1, *Hordeum vulgare*, BAJ96655; BsWHY1, *Brachypodium sylvaticum*, ABL85062; BdWHY1, *Brachypodium distachyon*, XP_003557198; SiWHY1, *Setaria italica*, XP_004964537; ZmWHY1, *Zea mays*, NP_001123589; SbWHY1, *Sorghum bicolor*, XP_002436467. Grün unterlegt = mit TargetP vorhergesagte plastidäre Transitsequenz, blau = WHIRLY-Domäne, rot = innerhalb der monokotylen WHIRLY1-Proteine konservierte N-terminale Sequenz.

Basierend auf dem Aminosäuresequenzvergleich, wurde der konservierte Bereich von Aminosäure 48 bis 58 (HvWHIRLY1 Δ 48–58; Δ 48–58; RHSADYFDPRAPP) sowie von 48 bis 60 (HvWHIRLY1 Δ 48–60; Δ 48–60; RHSADYFDPRAPRA) innerhalb der WHIRLY1-Sequenz der Gerste deletiert. Sowohl die Überexpression von HvWHIRLY1 Δ 48–58 (Δ 48–58 +A) als auch von HvWHIRLY1 Δ 48–60 (Δ 48–60 +A) führt zu einer Aufhebung des inhibierenden HvWHIRLY1-Effekts auf das Zellwachstum (Abb. 27). Dies zeigt, dass das Motiv, das die Kompaktierung der Nukleotide vermittelt, innerhalb dieses Sequenzbereichs zu finden ist.

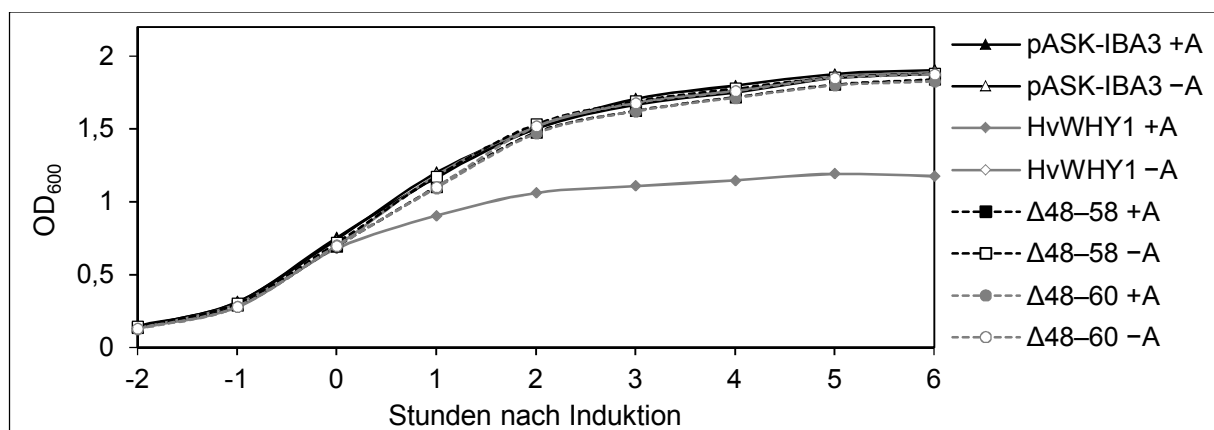


Abb. 27: Zellwachstum von *E. coli* nach heterologer Überexpression der HvWHIRLY1 Δ 48–58- bzw. HvWHIRLY1 Δ 48–60-Sequenz.

Für die Überexpression wurden die Konstrukte pASK-IBA3/HvWHY1 Δ 48–58 und pASK-IBA3/HvWHY1 Δ 48–60 verwendet. Die Induktion der Überexpression erfolgte zum Zeitpunkt „0“ mit 0,2 μ M Anhydrotetracyclin. Δ 48–58 = Deletion der Aminosäuren 48 bis 58 (RHSADYFDPRAPRA), Δ 48–60 = Deletion der Aminosäuren 48 bis 60 (RHSADYFDPRAPP), +A = Induktion mit 0,2 μ M Anhydrotetracyclin, -A = keine Induktion, OD₆₀₀ = optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm.

Innerhalb des konservierten N-terminalen Bereichs ist vor allem der Prolin-reiche Bereich PRAPP von Aminosäure 66 bis 72 (56 bis 60 in HvWHIRLY1) interessant (Abb. 26), in dem zudem ein Arginin lokalisiert ist. Prolin ist eine zyklische Aminosäure, bei der das Stickstoffatom zusammen mit der Seitenkette eine starre Ringstruktur ausbildet (Betts & Russell 2003). Die Ringstruktur verhindert eine flexible Konformationsänderung der Seitenkette. Durch die eingeschränkte Konformation können Proline nicht in α -Helices auftreten, weshalb sie als Helixbrecher bezeichnet werden. Sie kommen häufig in β -Schleifen vor und führen Knicks in die Proteinstruktur ein. Arginin ist hingegen eine positiv geladene Aminosäure, die auf Grund ihrer Ladung negativ geladene Moleküle wie DNA binden kann (Betts & Russell 2003). Das PRAPP-Motiv ist in den WHIRLY1-Proteinen aus Gerste, Mais, *O. sativa*, *Setaria italica* (*S. italica*) und *Sorghum bicolor* (*S. bicolor*) zu finden, während in den WHIRLY1-Proteinen aus *Brachypodium sylvaticum* (*B. sylvaticum*) und *Brachypodium distachyon* (*B. distachyon*) das PRAPP-Motiv nach dem Arginin durch drei weitere Aminosäuren (PRARTPPP bzw. PRARAPPP) unterbrochen ist. In fünf monokotylen

Arten u. a. Mais, aber nicht in der Gerste, folgen direkt auf das PRAPP-Motiv zwei weitere Proline (Aminosäuren 74 und 75 im Sequenzvergleich in Abb. 26). Die Überproduktion des ZmWHIRLY1-Proteins führt zu einem stärker inhibierenden Effekt auf das bakterielle Zellwachstum (Kapitel 3.2.4, Abb. 21), was auf die zusätzlichen Proline nach dem PRAPP-Motiv zurückgeführt werden könnte.

Um zu prüfen, ob das PRAPP-Motiv bzw. die Proline an der Verpackung der Nukleide in *E. coli* beteiligt sind, wurden zwei Mutationen eingeführt: die Deletion des PRAPP-Motivs (HvWHIRLY1 Δ PRAPP; Δ PRAPP) und der Austausch der drei Proline innerhalb des PRAPP-Motivs gegen Alanine (HvWHIRLY1P56/59/60A; P56/59/60A). Beide Mutationen bewirken eine Aufhebung der Effekte von HvWHIRLY1 auf die *E. coli*-Zellen. Sowohl das Zellwachstum (Abb. 28) als auch die Kompaktierung der Nukleide (Abb. 29) ist nicht zu unterscheiden von Zellen, in denen die Expression von HvWHIRLY1 nicht induziert worden ist.

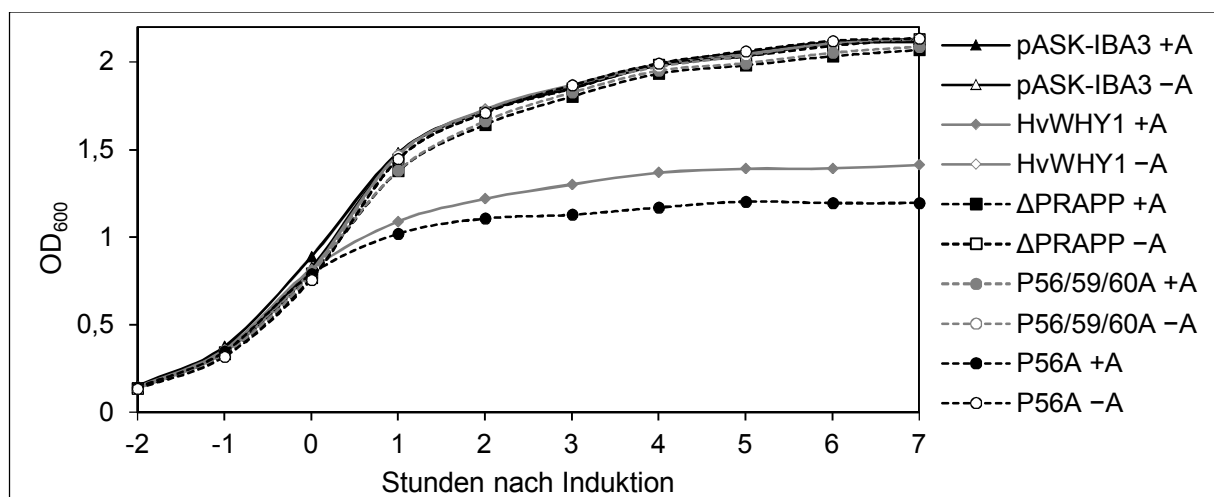


Abb. 28: Zellwachstum von *E. coli* nach heterologer Überexpression von HvWHIRLY1-Sequenzen, die innerhalb des PRAPP-Motivs mutiert sind.

Für die Überexpression wurden die Konstrukte pASK-IBA3/HvWHY1 Δ PRAPP, pASK-IBA3/HvWHY1P56/59/60A und pASK-IBA3/HvWHY1P56A verwendet. Die Induktion der Überexpression erfolgte zum Zeitpunkt „0“ mit 0,2 μ M Anhydrotetracyclin. Δ PRAPP = Deletion der Aminosäuren 56 bis 60 (PRAPP), P56/59/60A = Austausch der Proline 56, 59 und 60 gegen Alanine, P56A = Austausch des Prolins 56 gegen ein Alanin, +A = Induktion mit 0,2 μ M Anhydrotetracyclin, -A = keine Induktion, OD₆₀₀ = optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm.

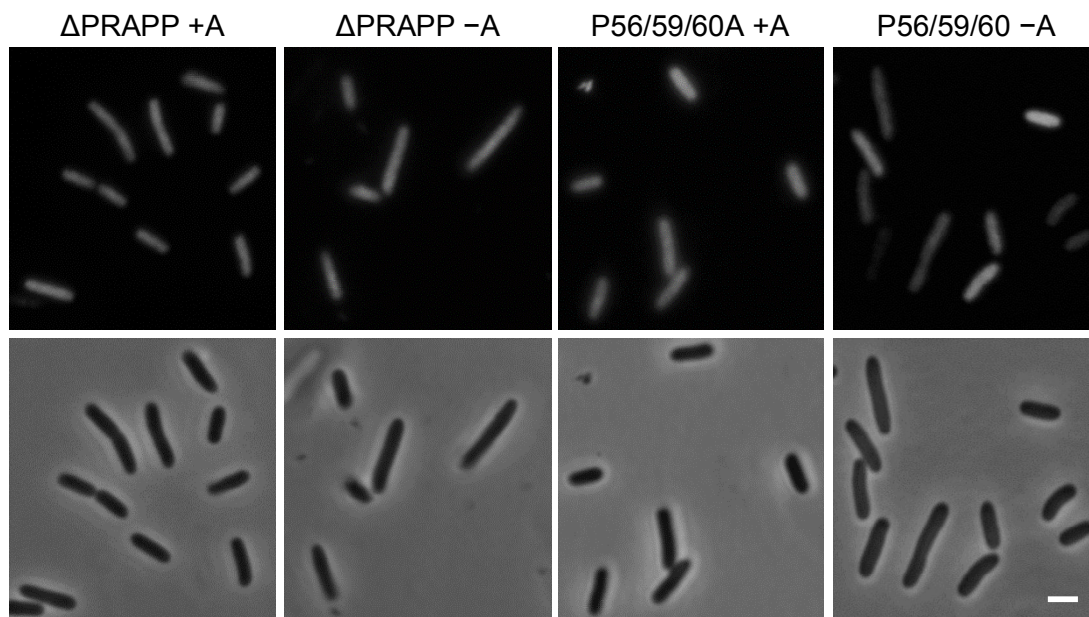


Abb. 29: Visualisierung bakterieller Nukleotide nach Überexpression der *HvWHIRLY1*ΔPRAPP- bzw. *HvWHIRLY1*P56/59/60A-Sequenz.

Die Färbung der bakteriellen Nukleotide erfolgte zwei Stunden nach der Induktion der Überexpression mit 1 µg/ml DAPI. Die obere Reihe zeigt die mittels DAPI angefärbte DNA. In der unteren Reihe sind die zugehörigen Phasenkontrastaufnahmen dargestellt. ΔPRAPP = Deletion der Aminosäuren 56 bis 60 (PRAPP), P56/59/60A = Austausch der Proline 56, 59 und 60 gegen Alanine, +A = *E. coli*-Zellen nach Induktion mit 0,2 µM Anhydrotetracyclin, -A = *E. coli*-Zellen ohne Induktion, Messbalken = 2 µm.

Die Ergebnisse aus der Überexpression von *HvWHIRLY1*P56/59/60A und die zuvor durchgeführten Wachstumsversuche mit *HvWHIRLY1*Δ48–58 und *HvWHIRLY1*Δ48–60 lassen vermuten, dass das Prolin 56 alleine für die Nukleoidverpackung ausreichen könnte. Trotz des Austausches von Prolin 56 zu einem Alanin (P56A) ist das Wachstum der *E. coli*-Zellen reduziert (Abb. 28), so dass die Wirkung von *HvWHIRLY1* durch den Austausch nicht aufgehoben werden kann. Die mit den mutierten *HvWHIRLY1*-Sequenzen durchgeführten Versuche zeigen, dass *HvWHIRLY1* für die Kompaktierung der Nukleotide das PRAPP-Motiv benötigt. Die Substitution der drei Proline gegen Alanine genügt, um die Kompaktierung der bakteriellen Nukleotide zu verhindern. Die alleinige Substitution des Prolins 56 ist nicht ausreichend.

Als basische Aminosäure könnte das Arginin im PRAPP-Motiv die entscheidende Rolle für die Kompaktierung der Nukleotide spielen. Nach dem Austausch des Arginins 57 innerhalb des PRAPP-Motivs durch ein Alanin (*HvWHIRLY1*R57A; R57A) hat das *HvWHIRLY1*R57A-Protein weder einen Einfluss auf das Zellwachstum (Abb. 30) noch auf die Verpackung der Nukleotide (Abb. 31). Daher kann davon ausgegangen werden, dass das Arginin direkt an der Nukleoidkompaktierung beteiligt ist. Da allerdings auch der Austausch der Proline 56, 59 und 60 trotz vorhandenem Arginin 57 den Effekt von *HvWHIRLY1* auf die Nukleotide aufhebt, ist ebenfalls der Kontext, die benachbarten Proline, wichtig für die Ausübung der

Verpackungsfunktion. Der immunologische Nachweis der rekombinanten HvWHIRLY1-Proteine HvWHIRLY1 Δ PRAPP (Δ PRAPP), HvWHIRLY1P56/59/60A (P56/59/60A) und HvWHIRLY1R57A (R57A) in Bakterienlysaten null und zwei Stunden nach der Induktion im Vergleich zur Akkumulation des nicht mutierten HvWHIRLY1-Proteins zeigt, dass zum Zeitpunkt der Induktion noch kein rekombinantes Protein nachweisbar ist, während zwei Stunden nach der Induktion je nach Mutation unterschiedliche Mengen detektierbar sind (Abb. 32). Bakterienlysate der Zellen, die die Wildtyp-Sequenz von HvWHIRLY1 überexprimieren, enthalten die geringste Menge an HvWHIRLY1. Im Vergleich dazu weisen Zellen nach Induktion der drei mutierten *HvWHIRLY1*-Sequenzen deutlich mehr rekombinantes Protein auf, wobei das Protein HvWHIRLY1R57A die stärkste Akkumulation in den Zellen zeigt.

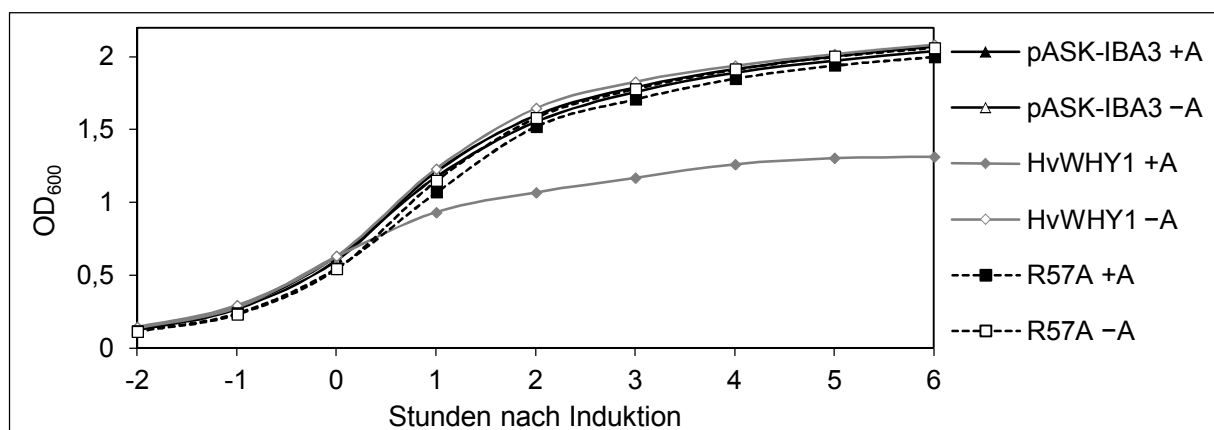


Abb. 30: Zellwachstum von *E. coli* nach heterologer Überexpression der *HvWHIRLY1R57A*-Sequenz.

Für die Überexpression wurde das Konstrukt pASK-IBA3/HvWHY1R57A verwendet. Die Induktion der Überexpression erfolgte zum Zeitpunkt „0“ mit 0,2 μ M Anhydrotetracyclin. R57A = Austausch des Arginins 57 gegen ein Alanin, +A = Induktion mit 0,2 μ M Anhydrotetracyclin, -A = keine Induktion, OD₆₀₀ = optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm.

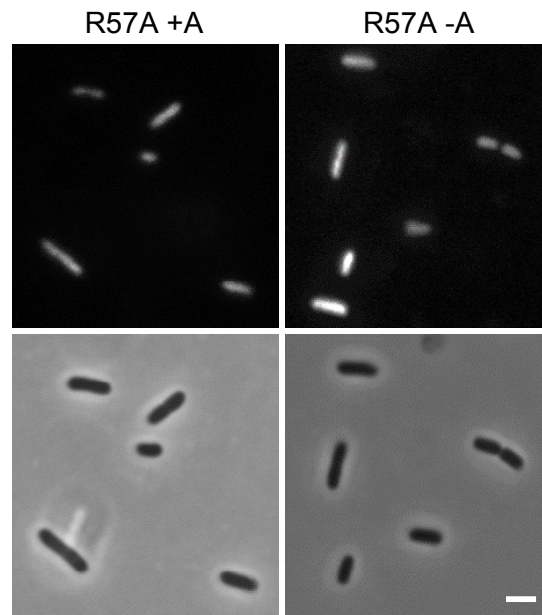


Abb. 31: Visualisierung bakterieller Nukleole nach Überexpression der *HvWHIRLY1R57A*-Sequenz.

Die Färbung der bakteriellen Nukleole erfolgte zwei Stunden nach der Induktion der Überexpression mit 1 µg/ml DAPI. Die obere Reihe zeigt die mittels DAPI angefärbte DNA. In der unteren Reihe sind die zugehörigen Phasenkontrastaufnahmen dargestellt. R57A = Austausch des Arginins 57 gegen ein Alanin, +A = *E. coli*-Zellen nach Induktion mit 0,2 µM Anhydrotetracyclin, -A = *E. coli*-Zellen ohne Induktion, Messbalken = 2 µm.

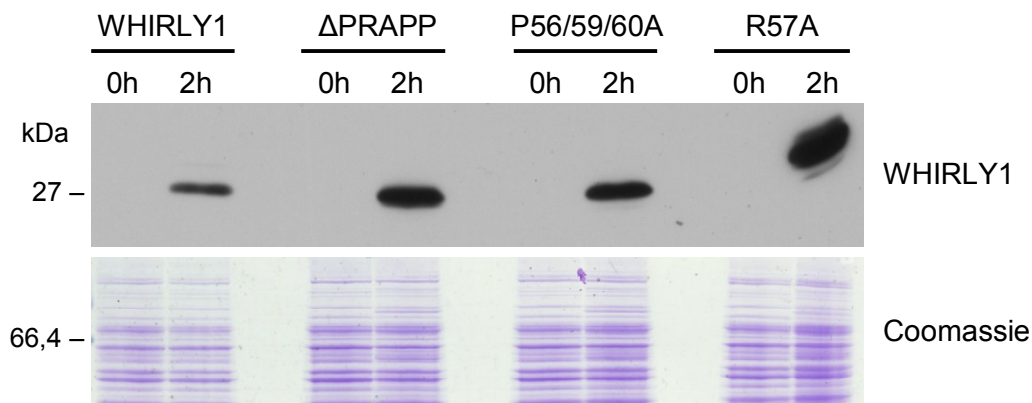


Abb. 32: Immunologischer Nachweis des rekombinanten *HvWHIRLY1ΔPRAPP*-, *HvWHIRLY1P56/59/60A*- und *HvWHIRLY1R57A*-Proteins.

Zum Zeitpunkt der Induktion (0h) und zwei Stunden nach der Induktion (2h) wurde jeweils 1 ml Flüssigkultur abgenommen. In Abhängigkeit von der gemessenen Zelldichte bei OD_{600} wurde die aus 1 ml Flüssigkultur pelletierten Zellen in 1 x PSB aufgenommen und auf das SDS-PA-Gel aufgetragen. Zur Detektion wurde der Antikörper gegen *HvWHIRLY1* eingesetzt. Als Beladungskontrolle wurde der obere Teil des SDS-PA-Gels mit Coomassie-Brilliantblau gefärbt, während der untere Teil für den Western Blot verwendet wurde. WHIRLY1 = Bakterienlysat der Zellen, die die *WHIRLY1*-Sequenz der Gerste überexprimierten, Δ PRAPP= Lysate der Zellen, die *HvWHIRLY1ΔPRAPP* überexprimierten, P56/59/60A = Lysate der Zellen, die *HvWHIRLY1P56/59/60A* überexprimierten, R57A = Lysate der Zellen, die *HvWHIRLY1R57A* überexprimierten.

Um zu prüfen, ob das Arginin innerhalb des PRAPP-Motivs auch artübergreifend für die Kompaktierung der Nukleole in monokotylen Pflanzen verantwortlich ist, wurde das homologe Arginin in der *WHIRLY1*-Sequenz des Maises gegen ein Alanin ausgetauscht (*ZmWHIRLY1R63A*; R63A). Wie bei *HvWHIRLY1R57A* ist nach Induktion der

Überexpression von *ZmWHIRLY1R63A* (R63A +A) eine Aufhebung der Wirkung des ZmWHIRLY1-Proteins auf das bakterielle Wachstum zu beobachten (Abb. 33, vergleiche auch Kapitel 3.2.4, Abb. 21). Auch der Effekt auf die bakteriellen Nukleotide wird durch die Mutation des Arginins aufgehoben (Abb. 34, vergleiche auch Kapitel 3.2.4, Abb. 22). Die Synthese des rekombinanten ZmWHIRLY1R63A-Proteins wurde unter Verwendung des α -ZmWHIRLY1-Antikörpers bestätigt (Anhang, Abb. 64). Damit konnte gezeigt werden, dass das PRAPP-Motiv mit dem enthaltenen Arginin auch im WHIRLY1-Protein des Maises für die Verpackung der Nukleotide verantwortlich ist. Durch die hohe Konservierung des PRAPP-Motivs in monokotylen WHIRLY1-Proteinen kann vermutet werden, dass dieses Motiv auch in anderen WHIRLY1-Proteinen von monokotylen Pflanzen eine Rolle bei der Kompaktierung der Nukleotide spielt.

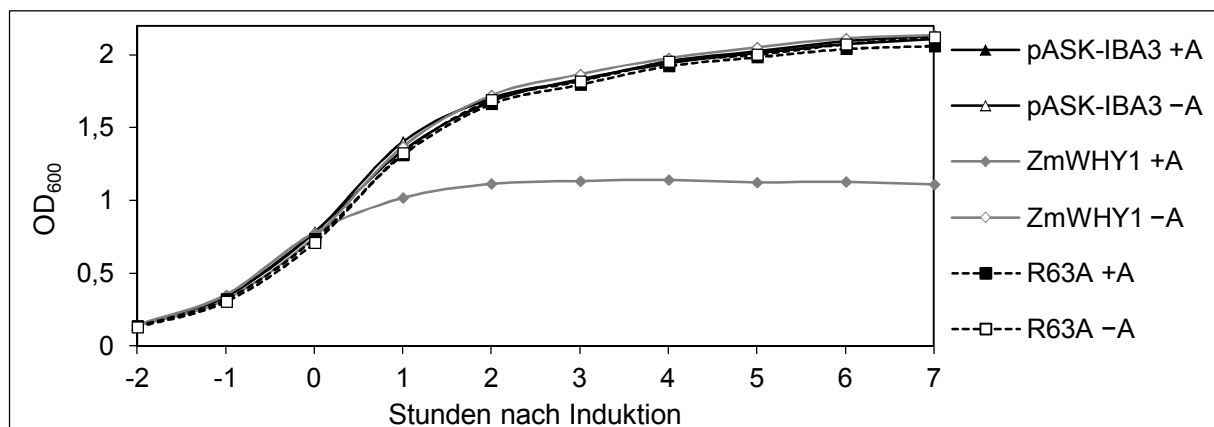


Abb. 33: Zellwachstum von *E. coli* nach heterologer Überexpression der *ZmWHIRLY1R63A*-Sequenz.

Für die Überexpression wurde das Konstrukt pASK-IBA3/ZmWHY1R63A verwendet. Die Induktion der Überexpression erfolgte zum Zeitpunkt „0“ mit 0,2 μ M Anhydrotetracyclin. R63A = Austausch des Arginins 63 gegen ein Alanin, +A = Induktion mit 0,2 μ M Anhydrotetracyclin, -A = keine Induktion, OD₆₀₀ = optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm.

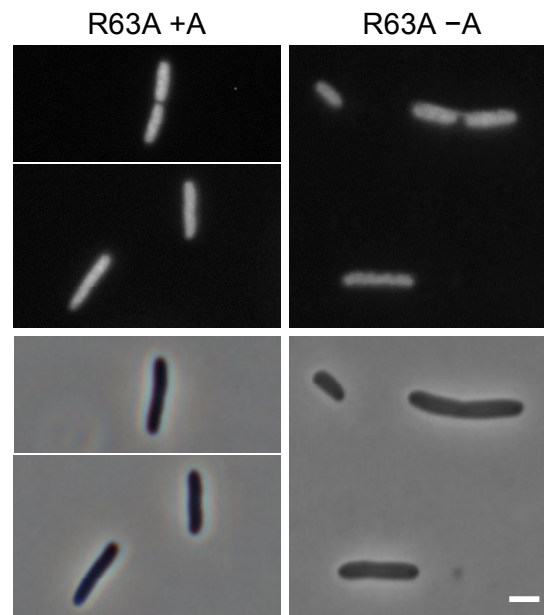


Abb. 34: Visualisierung bakterieller Nukleide nach Überexpression der *ZmWHIRLY1R63A*-Sequenz.

Die Färbung der bakteriellen Nukleide erfolgte zwei Stunden nach der Induktion der Überexpression mit 1 µg/ml DAPI. Die obere Reihe zeigt die mittels DAPI angefärbte DNA. In der unteren Reihe sind die zugehörigen Phasenkontrastaufnahmen dargestellt. R63A = Austausch des Arginins 63 gegen ein Alanin, +A = *E. coli*-Zellen nach Induktion mit 0,2 µM Anhydrotetracyclin, -A = *E. coli*-Zellen ohne Induktion, Messbalken = 2 µm.

3.2.7 Untersuchungen zum Einfluss der WHIRLY2-Proteine auf die Nukleoidverpackung in *E. coli*

Die heterologen Expressionsstudien mit den beiden WHIRLY1-Proteinen von Gerste und Mais haben gezeigt, dass das N-terminal gelegene PRAPP-Motiv der monokotylen WHIRLY1-Proteine die Kompaktierung der Nukleide in *E. coli* bewirkt. Darüber hinaus konnte weder für das WHIRLY1- noch für das WHIRLY3-Protein von Arabidopsis, die beide über kein PRAPP-Motiv verfügen, ein kompakterer Effekt auf die bakteriellen Nukleide nachgewiesen werden. Neben dem plastidären WHIRLY1-Protein (bzw. WHIRLY3-Protein) verfügen Höhere Pflanzen zudem über das WHIRLY2-Protein, das in den Mitochondrien lokalisiert ist (Krause et al. 2005). Um zu prüfen, ob WHIRLY2-Proteine auch ein PRAPP-Motiv besitzen, wurde ein Sequenzvergleich aller in dieser Arbeit untersuchten reifen WHIRLY-Proteine (Abb. 35) sowie der WHIRLY-Proteine von *Brassica napus* (*B. napus*) und *S. tuberosum* und des WHIRLY2-Proteins des Maises durchgeführt. Während *Brassica napus* wie Arabidopsis drei WHIRLY-Proteine aufweist, verfügt *S. tuberosum* wie die meisten Arten nur über zwei WHIRLY-Proteine.

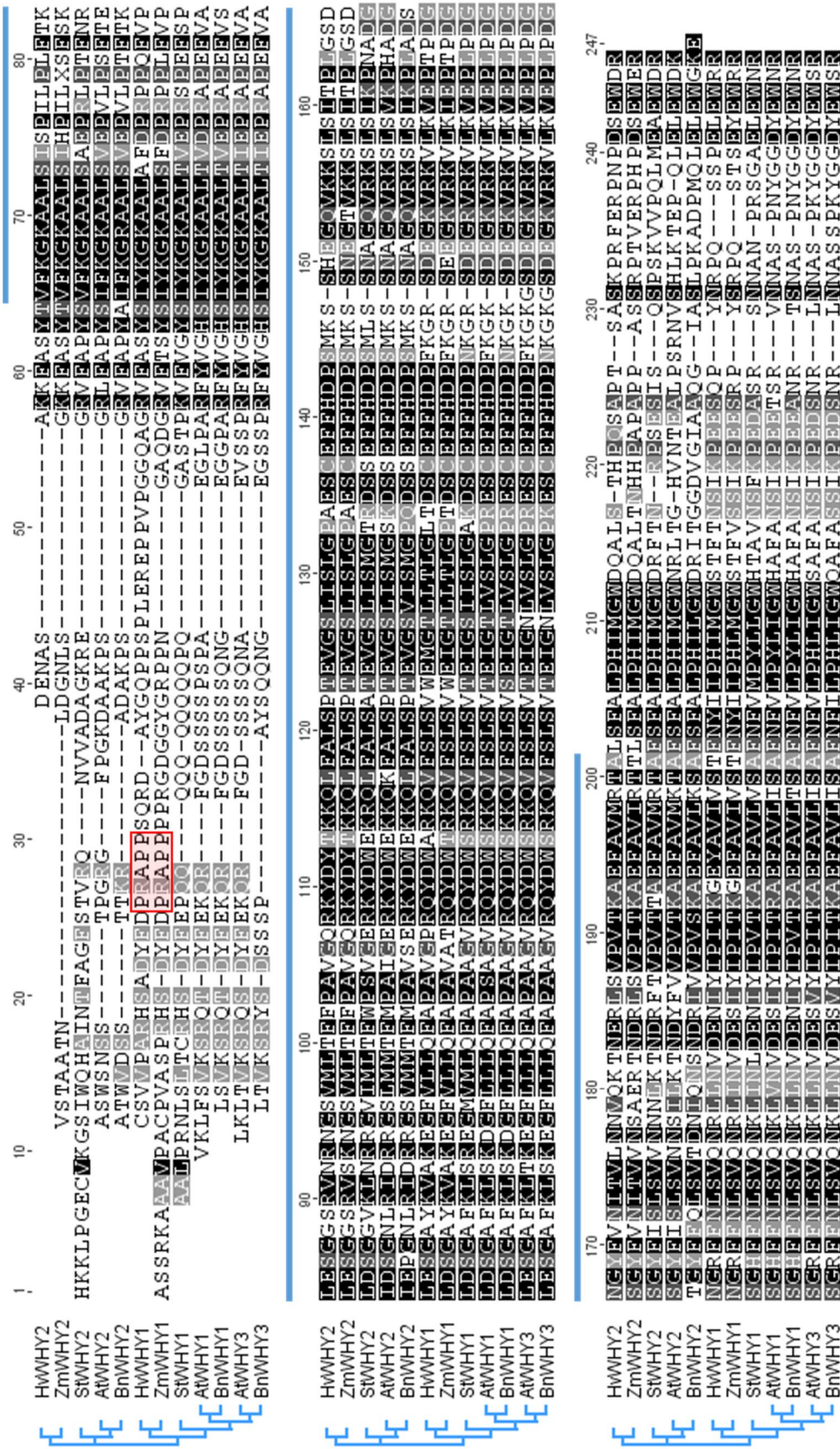


Abb. 35: Aminosäuresequenzvergleich der untersuchten reifen WHIRLY-Proteine sowie der WHIRLY-Proteine aus *Brassica napus* und *Solanum tuberosum*. Der Sequenzvergleich mit integriertem Stammbaum wurde mit Geneious 8.1.6 (ClustalW) erstellt. Die plastidäre Transitsequenz bzw. die mitochondriale Präsequenz wurde mit TargetP ermittelt und für den Sequenzvergleich entfernt. Konservierte Aminosäuren sind schwarz (100% Ähnlichkeit), dunkelgrau (80–100% Ähnlichkeit) bzw. hellgrau (60–80% Ähnlichkeit) unterlegt. Die folgenden Proteinsequenzen wurden für den Vergleich verwendet (Name, Organismus, GenBank Accessionnummer): HwWHY2, *Hordeum vulgare*, BF627441.2, proteinkodierender offene Leserahmen +3 von Nukleotid 39–740; ZmWHY2, *Zea mays*, NP_001152589; StWHY2, *Solanum tuberosum*, NP_001275393.1; AtWHY2, *Arabidopsis thaliana*, NP_177282.2; BnWHY2, *Brassica napus*, XP_013698993; HwWHY1, *Hordeum vulgare*, BAJ96655; ZmWHY1, *Zea mays*, NP_001123589; StWHY1, *Solanum tuberosum*, NP_001275155.1; AtWHY1, *Arabidopsis thaliana*, NP_172893; BnWHY1, *Brassica napus*, CDY66532; AtWHY3, *Arabidopsis thaliana*, NP_178377; BnWHY3, *Brassica napus*, CDY45200. Blau = WHIRLY-Domäne, rot = PRAPP-Motiv.

Der Sequenzvergleich zeigt, dass WHIRLY2-Proteine weder in monokotylen noch in dikotylen Pflanzen ein PRAPP-Motiv besitzen (Abb. 35). Das PRAPP-Motiv ist ausschließlich in WHIRLY1-Proteinen aus monokotylen Pflanzen zu finden. Dies ist auch in einem Aminosäuresequenzvergleich mit weiteren WHIRLY1- und WHIRLY2-Proteinen von ausschließlich monokotylen Arten zu sehen (Anhang, Abb. 66). Außerdem wird aus diesem Sequenzvergleich ersichtlich, dass die WHIRLY2-Proteine aus Monokotyledonen einen deutlich verkürzten N-Terminus besitzen, der hauptsächlich aus der mitochondrialen Präsequenz besteht. Studien an *Arabidopsis* konnten zeigen, dass WHIRLY2 unspezifisch an DNA bindet und mit der mtDNA kolokalisiert (Maréchal et al. 2008; Tarasenko et al. 2012; Cai et al. 2015). Trotz widersprüchlicher Ergebnisse zweier Studien (Maréchal et al. 2008; Cai et al. 2015), scheint AtWHIRLY2 einen Einfluss auf die Menge der mtDNA zu haben, genau wie in der vorliegenden Arbeit für das WHIRLY1-Protein der Gerste gezeigt werden konnte. Aus diesen Gründen wurden auch die WHIRLY2-Proteine von Gerste und *Arabidopsis* trotz fehlendem PRAPP-Motiv im Hinblick auf eine mögliche Kompaktierungsaktivität untersucht.

Um zu überprüfen, ob die WHIRLY2-Proteine den Kompaktierungsgrad der bakteriellen Nukleotide ändern können, wurden die Sequenzen, die für die reifen WHIRLY2-Proteine von Gerste (*HvWHIRLY2*; *HvWHY2*) und *Arabidopsis* (*AtWHIRLY2*; *AtWHY2*) kodieren heterolog in *E. coli* exprimiert. Die mitochondriale Transitsequenz wurde dabei mittels TargetP ermittelt und für die Überexpression entfernt. Weder die Überexpression von *HvWHIRLY2* (*HvWHY2* +A) noch von *AtWHIRLY2* (*AtWHY2* +A) führt zu einem veränderten bakteriellen Zellwachstum (Abb. 36). WHIRLY2-Proteine haben somit keinen Effekt auf die Kompaktierung bakterieller Nukleotide, wie zudem nach Färbung der Nukleotide mit DAPI erkennbar wird (Abb. 37). Die Akkumulation der rekombinanten Proteine zwei Stunden nach der Induktion wurde immunologisch bestätigt (Anhang, Abb. 67). Demnach können weder die in dieser Arbeit untersuchten WHIRLY1- und WHIRLY3-Proteine von *Arabidopsis* noch die WHIRLY2-Proteine von Gerste und *Arabidopsis* die Kompaktierung bakterieller Nukleotide verändern. Nur die monokotylen WHIRLY1-Proteine, die als einzige WHIRLY-Proteine das PRAPP-Motiv besitzen, haben diese Wirkung.

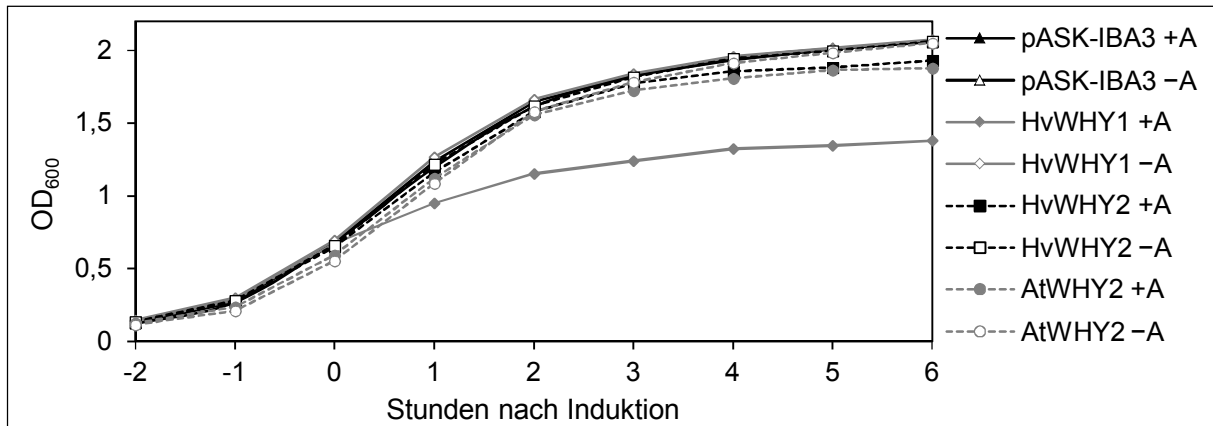


Abb. 36: Zellwachstum von *E. coli* nach heterologer Überexpression der *WHIRLY2*-Sequenzen von Gerste und *Arabidopsis* im Vergleich zur *WHIRLY1*-Sequenz der Gerste.

Für die Überexpression wurden die Konstrukte pASK-IBA3/HvWHY1 (HvWHY1), pASK-IBA3/HvWHY2 (HvWHY2) bzw. pASK-IBA3/AtWHY2 (AtWHY2) verwendet. In den drei Konstrukten ist die kodierende Sequenz für das jeweilige reife WHIRLY-Protein (TargetP) am 3'-Ende mit der Sequenz eines Strep-Tags fusioniert. Die Induktion der Überexpression erfolgte zum Zeitpunkt „0“ mit 0,2 μ M Anhydrotetracyclin. +A = Induktion mit 0,2 μ M Anhydrotetracyclin, -A = keine Induktion, OD₆₀₀ = optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm.

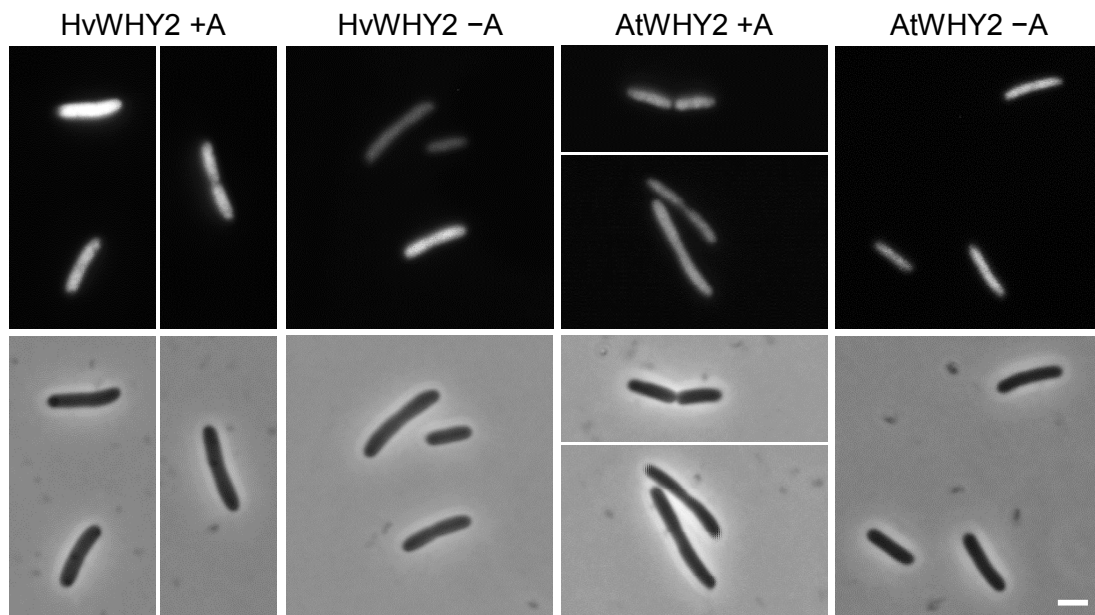


Abb. 37: Visualisierung bakterieller Nukleole nach Überexpression der *WHIRLY2*-Sequenz von Gerste bzw. *Arabidopsis*.

Die Färbung der bakteriellen Nukleole erfolgte zwei Stunden nach der Induktion der Überexpression mit 1 μ g/ml DAPI. Die obere Reihe zeigt die mittels DAPI angefärbte DNA. In der unteren Reihe sind die zugehörigen Phasenkontrastaufnahmen dargestellt. +A = *E. coli*-Zellen nach Induktion mit 0,2 μ M Anhydrotetracyclin, -A = *E. coli*-Zellen ohne Induktion, Messbalken = 2 μ m.

3.2.8 Einfluss eines chimären Proteins aus dem WHIRLY1-Protein von Arabidopsis und dem PRAPP-Motiv auf die Nukleotide von *E. coli*

Die bisherigen Untersuchungen haben gezeigt, dass nur die monokotylen WHIRLY1-Proteine über das PRAPP-Motiv verfügen und damit als Kompaktierungsproteine für bakterielle Nukleotide fungieren können. Zur Klärung der Frage, ob das WHIRLY1-Protein von Arabidopsis auch als Kompaktierungsprotein wirken kann, wenn es ein PRAPP-Motiv besitzt, wurde ein chimäres Protein aus dem WHIRLY1-Protein von Arabidopsis und dem PRAPP-Motiv des WHIRLY1-Proteins der Gerste erstellt. Zur Identifizierung einer geeigneten Insertionsstelle erfolgte ein Aminosäuresequenzvergleich der reifen WHIRLY1-Proteine von Gerste und Arabidopsis (Abb. 38). Der Sequenzvergleich zeigt, dass die beiden WHIRLY1-Proteine vor und hinter dem rot markierten PRAPP-Motiv eine große Sequenzähnlichkeit aufweisen (grauer Bereich in Abb. 38; DYFDPRAPPSQR in HvWHIRLY1 im Vergleich zu DYFE----KQR in AtWHIRLY1). Von den sieben angrenzenden Aminosäuren sind fünf identisch und zwei besitzen sehr ähnliche bzw. teilweise ähnliche chemische Eigenschaften, so dass das PRAPP-Motiv an dieser Stelle (DYFEP**PRAPP**KQR) mittels ortsspezifischer Mutagenese in die *AtWHIRLY1*-Sequenz inseriert werden konnte.

HvWHIRLY1	MCSVVPAR-HSADYFD PRAPPSQR DAYGQPPSPLEREPPVPGGQAGRVFASYSIYK GKAA	59
AtWHIRLY1	MVKLFSVKSRQTDYFE-----KQR--FGDSSS-----SPSPAEGLPARFYVGHSIYK GKAA	49
	* : : : *** : . ** : * : . . * . * . . * . . * . . : : : *****	
HvWHIRLY1	LAFDPRPPQFVPLESGAYKVAKEGFVLLQFAPAVGPRQYDWARDKQVFSLSVWEMGTLTLL	119
AtWHIRLY1	LTVDPRAPEFVALDSGAFKLSKDGFLLLQFAPSAGVRQYDWSKKQVFSLSVTEIGTLVSL	109
	* : . *** . * : * . * : *** : * : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
HvWHIRLY1	GLTDSCEFFHDPFKGRSDEGKVRKVLKVEPTPDGNGRFFNLSVQNRLNVDENIYIPITK	179
AtWHIRLY1	GPRESCEFFHDPFKGKSDEGKVRKVLKVEPLPDGSGHFFNLSVQNKLVNVDESIYIPITR	169
	* : ***** : ***** : ***** : ***** : ***** : ***** : ***** : ***** : ***** :	
HvWHIRLY1	GEYAVIVSTFNYYIIPHIMGWSTFTNSIKPEESQPYN--RPQSSPELEWRR	227
AtWHIRLY1	AEFAVLISAFNFVLPYLIGWHAFANSIKPEETSRVNNASPNYGGDYEWNR	219
	. * : *	

Abb. 38: Vergleich der Aminosäuresequenz des reifen WHIRLY1-Proteins von Gerste (HvWHIRLY1) und Arabidopsis (AtWHIRLY1).

Das PRAPP-Motiv ist rot und die angrenzenden Aminosäuren sind grau unterlegt.

Die *AtWHIRLY1*-Sequenz mit dem PRAPP-Motiv (*AtWHIRLY1*+PRAPP; *AtWHY1*+PRAPP) wurde anschließend in *E. coli* exprimiert (Abb. 39). Zum Vergleich sind zudem Zellen, welche die *HvWHIRLY1*-Sequenz bzw. die *AtWHIRLY1*-Sequenz exprimieren, dargestellt. Wie bereits in Kapitel 3.2.4 gezeigt wurde, führt eine Überexpression von *AtWHIRLY1* (*AtWHY1* +A) zu keiner Veränderung des bakteriellen Wachstums. Nach Induktion der

Expression der chimären Sequenz *AtWHIRLY1+PRAPP* (*AtWHY1+PRAPP* +A) zeigen die Zellen ein deutlich reduziertes Wachstum, wobei *AtWHIRLY1+PRAPP* sogar noch einen stärkeren Effekt auf das Zellwachstum als *HvWHIRLY1* (*HvWHY1* +A) hat.

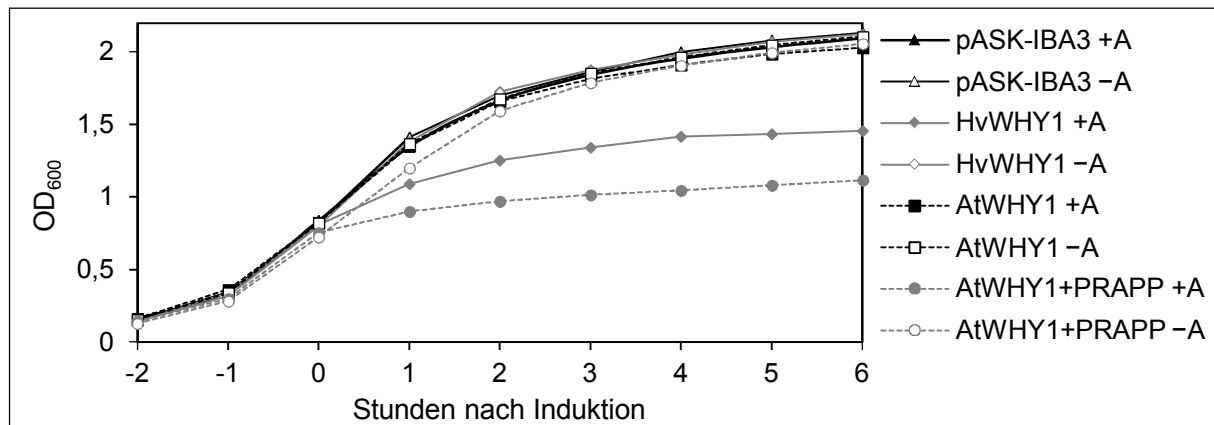


Abb. 39: Zellwachstum von *E. coli* nach heterologer Überexpression der chimären *AtWHIRLY1+PRAPP*-Sequenz.

Für die Überexpression wurde das Konstrukt pASK-IBA3/*AtWHY1+PRAPP* verwendet. Die Induktion der Überexpression erfolgte zum Zeitpunkt „0“ mit 0,2 µM Anhydrotetracyclin. +A = Induktion mit 0,2 µM Anhydrotetracyclin, -A = keine Induktion, OD₆₀₀ = optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm.

Der immunologische Nachweis des chimären Proteins erfolgte mit dem Strep-Tactin®-HRP-Konjugat. Dazu wurden Bakterienlysate null und zwei Stunden nach der Induktion der Expression von *AtWHIRLY1+PRAPP* verwendet. Zum Vergleich wurden Bakterienlysate der Zellen, die das *WHIRLY1*-Protein der Gerste bzw. von *Arabidopsis* synthetisierten, untersucht. Es ist zu erkennen, dass die *E. coli*-Zellen, in denen das *WHIRLY1*-Protein der Gerste (*HvWHY1*) synthetisiert wird, deutlich weniger rekombinantes *WHIRLY1*-Protein akkumulieren als Zellen, welche die *WHIRLY1*-Sequenz von *Arabidopsis* (*AtWHY1*) überexprimieren (Abb. 40). Im Unterschied dazu führt die Überproduktion des chimären *AtWHIRLY1+PRAPP*-Proteins (*AtWHY1+PRAPP*) zu einer deutlich reduzierten Menge an rekombinantem Protein im Vergleich zu *AtWHIRLY1*. Die Färbung der Nukleole zwei Stunden nach Induktion bestätigt zudem, dass das chimäre Protein in der Lage ist, die Verpackung der bakteriellen Nukleole zu verändern (Abb. 41). Wie das *WHIRLY1*-Protein der Gerste bewirkt das *AtWHIRLY1+PRAPP*-Protein eine verstärkte Kompaktierung der Nukleole, so dass ein oder zwei punktförmige Nukleole in der Zelle zu erkennen sind. Die heterologe Expression der chimären Sequenz hat gezeigt, dass nur das *PRAPP*-Motiv innerhalb der *WHIRLY1*-Sequenz für die Kompaktierung der bakteriellen Nukleole verantwortlich ist. Ob ein *WHIRLY1*-Protein als Kompaktierungsprotein fungieren kann, entscheidet somit einzig die Anwesenheit eines *PRAPP*-Motivs.

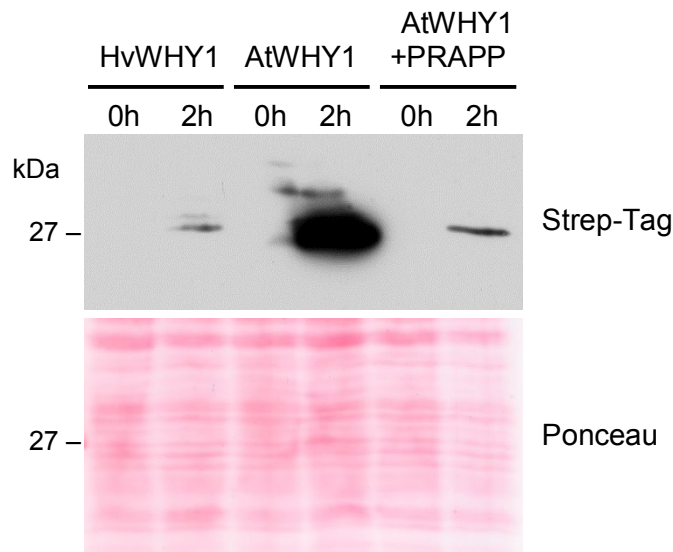


Abb. 40: Immunologischer Nachweis des rekombinanten AtWHIRLY1+PRAPP-Proteins im Vergleich zu HvWHIRLY1 und AtWHIRLY1.

Zum Zeitpunkt der Induktion (0h) und zwei Stunden nach der Induktion (2h) wurde jeweils 1 ml Flüssigkultur abgenommen. In Abhängigkeit von der gemessenen Zelldichte bei OD_{600} wurde die aus 1 ml Flüssigkultur pelletierten Zellen in 1 x PSB aufgenommen und auf das SDS-PA-Gel aufgetragen. Zur Detektion wurde das Strep-Tactin®-HRP-Konjugat eingesetzt. Zur Kontrolle der Beladung wurde die Membran vor der Detektion mit Ponceau S angefärbt. HvWHY1 = Bakterienlysat der Zellen, die *HvWHIRLY1* überexprimierten, AtWHY1 = Lysate der Zellen, die *AtWHIRLY1* überexprimierten, AtWHY1+PRAPP = Lysate der Zellen, die *AtWHIRLY1+PRAPP* überexprimierten.

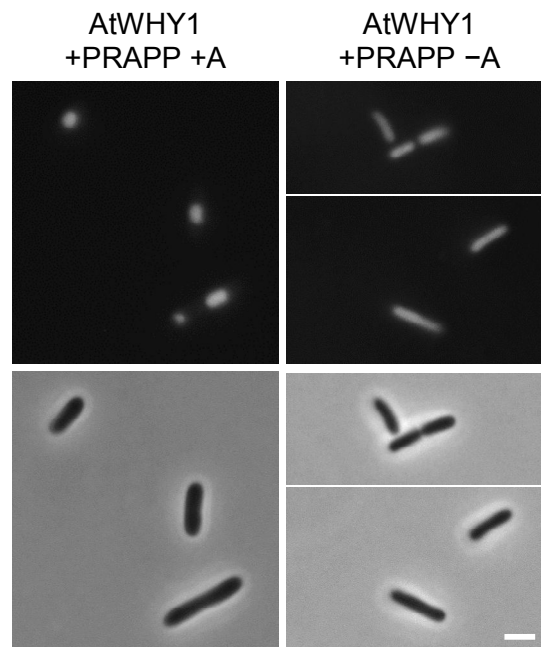


Abb. 41: Visualisierung bakterieller Nukleotide nach Überexpression der chimären Sequenz aus AtWHIRLY1 und dem PRAPP-Motiv.

Die Färbung der bakteriellen Nukleotide erfolgte zwei Stunden nach der Induktion der Überexpression mit 1 $\mu\text{g/ml}$ DAPI. Die obere Reihe zeigt die mittels DAPI angefärbte DNA. In der unteren Reihe sind die zugehörigen Phasenkontrastaufnahmen dargestellt. +A = *E. coli*-Zellen nach Induktion mit 0,2 μM Anhydrotetracyclin, -A = *E. coli*-Zellen ohne Induktion, Messbalken = 2 μm .

3.3 Lichtabhängige Regulation des WHIRLY1-Proteins der Gerste und der Nukleoidkompaktierung

3.3.1 Abhängigkeit der WHIRLY1-Proteinmenge von der Lichtintensität

Im Vorfeld dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich die Menge des HvWHIRLY1-Proteins in Gerstenprimärblättern des Wildtyps in Abhängigkeit von der Lichtintensität ändert. So kommt es mit steigender Lichtintensität zu einer Reduktion der HvWHIRLY1-Proteinmenge (unveröffentlichte Daten, S. Braun). Im Folgenden wurde die Akkumulation des HvWHIRLY1-Proteins zum einen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien des Gerstenprimärblattes und zum anderen in Abhängigkeit von der Lichtintensität untersucht. Dazu wurden der Wildtyp und die WHIRLY1-RNAi-Linien 1 und 7 nach Aussaat auf Erde und dreitägiger Kälteinduktion entweder für vier Tage ohne Dunkelphase im Schwachlicht (SL), im Hochlicht (HL) oder für drei Tage im Schwachlicht und für einen weiteren Tag im Hochlicht (Transfer, SL → HL) kultiviert (2.2.1). Anschließend wurden das basale, mittlere und apikale Blattsegment (wie in Kapitel 3.1.1, Abb. 6A) von sieben Tage alten Primärblättern aus den drei unterschiedlichen Lichtbedingungen im Hinblick auf die HvWHIRLY1-Proteinmenge untersucht. Aus den drei Segmenten wurde das Gesamtprotein extrahiert (2.4.4) und für immunologische Untersuchungen verwendet (2.4.8, 2.4.9, 2.4.10 und 2.4.12). Die sieben Tage alten Primärblätter des Wildtyps und der beiden WHIRLY1-RNAi-Linien 1 und 7 in den untersuchten Lichtbedingungen Schwachlicht (SL), Hochlicht (HL) und Transfer (SL → HL) sind exemplarisch abgebildet (Abb. 42).

Die größten Veränderungen weist die WHIRLY1-RNAi-Linie 7 (W1-7) auf, welche gleichzeitig über die geringste HvWHIRLY1-Proteinmenge verfügt (Kapitel 3.1.2, Tab. 11). Primärblätter der Linie W1-7 zeigen im Vergleich zum Wildtyp und zur Linie W1-1 in allen Lichtbedingungen ein reduziertes Wachstum. Nach der Anzucht im Hochlicht erscheint die gesamte Blattspreite der Linie W1-7 mit Ausnahme der Blattspitze heller als die des Wildtyps. Die weiße bis gelbliche Aufhellung ist am deutlichsten im unteren Bereich der Blattspreite zu sehen. Zur Blattspitze geht die gelbliche Färbung allmählich in ein helles Grün über. Im Schwachlicht und nach dem Transfer der Pflanzen ins Hochlicht ist ebenfalls eine hellere Blattspreite erkennbar. Während der weiteren Entwicklung geht diese phänotypische Ausprägung zurück und ist in zehn Tage alten Primärblättern nur noch in der unteren Blattspreite zu beobachten (unveröffentlichte Daten, U. Voigt). W1-1 unterscheidet sich im Unterschied zu W1-7 nur geringfügig vom Wildtyp. Die Blattspreite der Linie W1-1 ist nur im unteren Drittel etwas heller als die des Wildtyps (Gelb bis Hellgrün) und zeigt wie W1-7 die

stärkste Ausprägung im Hochlicht. Der RNAi-Phänotyp der beiden Linien geht demnach mit der verbleibenden Menge an HvWHIRLY1-Protein einher. Die Linie W1-7, welche in 16 µg Gesamtprotein über kein immunologisch nachweisbares HvWHIRLY1-Protein verfügt (Kapitel 3.1.2, Tab. 11), zeigt den stärksten Phänotyp. Die Linie W1-1, in der noch etwa 10 % der Menge des Wildtyps vorhanden ist, weist hingegen nur einen sehr schwachen Phänotyp auf, der zwischen dem des Wildtyps und dem der Linie W1-7 liegt. Die hellere Blattspreite der beiden RNAi-Linien nach Anzucht im Schwachlicht könnte auf eine verzögerte Chloroplastenentwicklung im jungen Gerstenprimärblatt hindeuten, wohingegen die stärkere Aufhellung nach Anzucht im Hochlicht auf einen photooxidativen Stress hinweisen könnte. Anders als die RNAi-Linien können beim Wildtyp keine optischen Unterschiede in den drei Lichtbedingungen beobachtet werden.

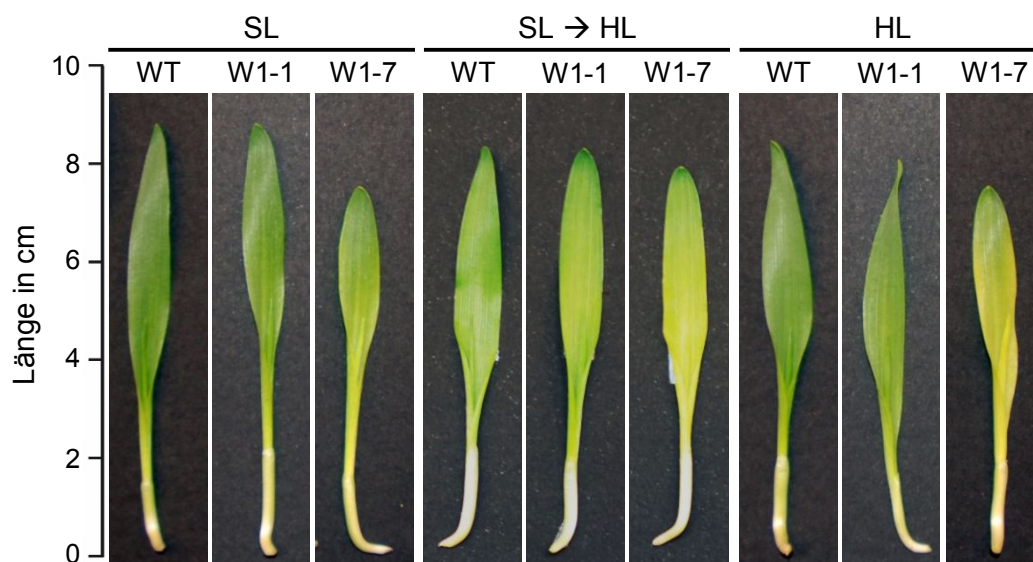


Abb. 42: Phänotyp von sieben Tage alten Gerstenprimärblättern des Wildtyps (WT) und der WHIRLY1-RNAi-Linien 1 (W1-1) und 7 (W1-7).

Die Pflanzen wurden auf Einheitserde in einer Klimakammer bei 21 °C und einer Luftfeuchte von 65 % in unterschiedlichen Lichtintensitäten angezogen. In den ersten drei Tagen erfolgte eine Kälteinduktion, danach wurden die Pflanzen für vier weitere Tage im Licht angezogen, so dass sie an Tag 7 für Versuche zur Verfügung standen. SL = Anzucht im Schwachlicht, SL → HL = die Pflanzen wurden am sechsten Tag für einen Tag aus dem Schwach- ins Hochlicht überführt, HL = Anzucht im Hochlicht.

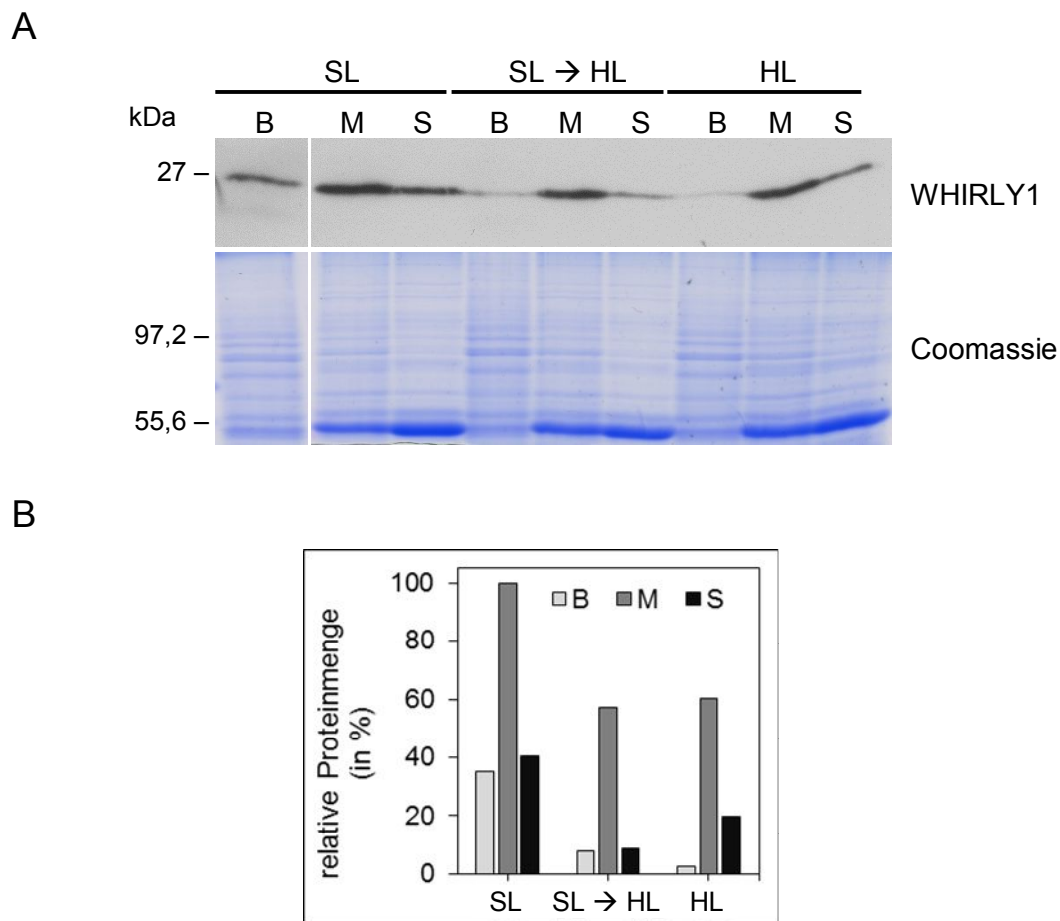


Abb. 43: Entwicklungsabhängige Veränderungen der HvWHIRLY1-Proteinmenge in sieben Tage alten Primärblättern des Wildtyps nach Anzucht in unterschiedlichen Lichtintensitäten.

A Von jeder Probe wurden 15 µg Gesamtproteinextrakt auf einem SDS-PA-Gel aufgetragen. Zur Detektion wurde der Antikörper gegen HvWHIRLY1 eingesetzt. Als Beladungskontrolle wurde der obere Teil des SDS-PA-Gels mit Coomassie-Brilliantblau gefärbt, während der untere Teil für den Western Blot verwendet wurde. **B** Densitometrische Auswertung der immunologischen Detektion von HvWHIRLY1 mit dem Programm ImageJ. Das stärkste Signal (Mitte, SL) wurde auf 100 % gesetzt, alle anderen Signale sind dazu im Verhältnis dargestellt. SL = Schwachlicht, SL → HL = die Pflanzen wurden am sechsten Tag für einen Tag aus dem Schwach- ins Hochlicht überführt, HL = Hochlicht, B = basales Blattsegment, M = mittleres Blattsegment, S = Spitzensegment.

Zur Überprüfung, ob unterschiedliche Lichtintensitäten einen Effekt auf die HvWHIRLY1-Proteinmenge haben, wurden immunologische Untersuchungen mit Gesamtproteinextrakten aus den drei Blattsegmenten (Kapitel 3.1.1, Abb. 6A) des Wildtyps und der Linien W1-1 und W1-7 durchgeführt. Der immunologische Nachweis von HvWHIRLY1 in den Segmenten des Wildtyps zeigt, dass in allen drei Lichtbedingungen die gleichen entwicklungsabhängigen Schwankungen des HvWHIRLY1-Proteins wie in Kapitel 3.1.1 zu erkennen sind (Abb. 43A). Allerdings sind unterschiedliche Mengen in Abhängigkeit von der Lichtintensität zu beobachten. Primärblätter der Pflanzen, die im Schwachlicht angezogen wurden, enthalten in allen drei Blattsegmenten am meisten HvWHIRLY1-Protein verglichen mit Pflanzen, die für einen Tag ins Hochlicht transferiert bzw. dauerhaft im Hochlicht angezogen wurden. Unabhängig von der Lichtintensität ist die größte Menge an HvWHIRLY1 immer im mittleren

Segment nachweisbar. In den drei Blattsegmenten der Pflanzen, die ins Hochlicht überführt wurden (SL → HL), kann eine deutliche Reduktion der HvWHIRLY1-Proteinmenge im Vergleich zu Segmenten der Pflanzen, die im Schwachlicht kultiviert wurden, detektiert werden. Nach Anzucht der Pflanzen im Hochlicht weisen alle drei Blattsegmente ebenfalls eine reduzierte Menge an HvWHIRLY1-Protein auf, die mit Ausnahme der Blattbasis schwächer ausfällt als in den Segmenten der Pflanzen, die aus dem Schwachlicht ins Hochlicht transferiert wurden (siehe auch Abb. 43B). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Menge an HvWHIRLY1-Protein im Wildtyp in höheren Lichtintensität abnimmt und dass sie unabhängig von der Lichtintensität den gleichen entwicklungsabhängigen Schwankungen unterliegt.

Zur Untersuchung, ob die HvWHIRLY1-Proteinmenge auch in den WHIRLY1-RNAi-Linien 1 und 7 bei höherer Lichtintensität sinkt, wurden immunologische Analysen mit Gesamtproteinextrakten der beiden RNAi-Linien durchgeführt. Um die geringen Mengen des HvWHIRLY1-Proteins in W1-1 deutlicher nachweisen zu können, wurden 30 µg Gesamtprotein von jeder Probe auf einem SDS-PA-Gel aufgetrennt. Wie im Wildtyp zeigt das HvWHIRLY1-Protein in W1-1 in allen drei Lichtbedingungen ähnliche Schwankungen während der Entwicklung (Abb. 44A). So steigt die Proteinmenge vom basalen zum mittleren Segment an und nimmt im Spitzensegment wieder ab. Anders als im Wildtyp nimmt die HvWHIRLY1-Proteinmenge in W1-1 in der Blattspitze stärker ab, so dass in allen Lichtbedingungen in der Blattspitze weniger HvWHIRLY1-Protein nachweisbar ist als in der Blattbasis. Wie im Wildtyp ist die größte Menge des HvWHIRLY1-Proteins in den Segmenten der Pflanzen, die im Schwachlicht kultiviert wurden, detektierbar. Nach Anzucht der Pflanzen im Hochlicht bzw. nach dem Transfer der Pflanzen ins Hochlicht ist in allen Segmenten eine geringere HvWHIRLY1-Proteinmenge im Vergleich zu Segmenten der Pflanzen, die im Schwachlicht kultiviert wurden, nachweisbar. Allerdings ist zwischen vergleichbaren Segmenten von Pflanzen, die ins Hochlicht überführt bzw. im Hochlicht angezogen wurden, kein Unterschied in der Menge des HvWHIRLY1-Proteins zu erkennen, was auch in der densitometrischen Auswertung deutlich wird (Abb. 44B). Vergleicht man die Akkumulation des HvWHIRLY1-Proteins in der Kontrolle mit der der Linie W1-1, fällt auf, dass die HvWHIRLY1-Proteinmenge im mittleren Segment nach Anzucht der Pflanzen im Schwachlicht, in welchem das meiste Protein in W1-1 nachweisbar ist, etwa 15 % des HvWHIRLY1-Proteins des Wildtyps in der Blattbasis nach Anzucht im Schwachlicht entspricht. In den anderen Proben der Linie W1-1 liegt die HvWHIRLY1-Proteinmenge allerdings deutlich unter diesem Wert.

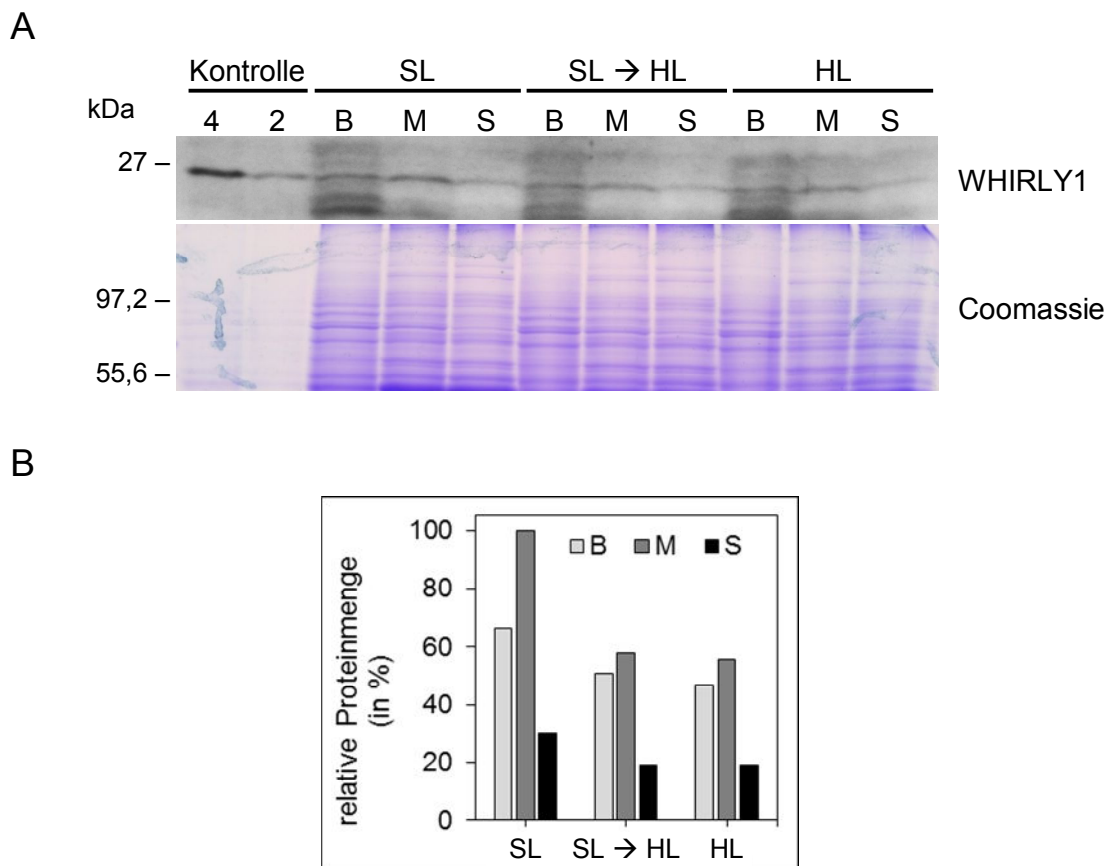


Abb. 44: Entwicklungsabhängige Veränderungen der HvWHIRLY1-Proteinmenge in sieben Tage alten Primärblättern der WHIRLY1-RNAi-Linie 1 (W1-1) nach Anzucht in unterschiedlichen Lichtintensitäten.

A Von jeder Probe wurden 30 µg Gesamtproteinextrakt auf einem SDS-PA-Gel aufgetragen. Zur Detektion wurde der Antikörper gegen HvWHIRLY1 eingesetzt. Als Beladungskontrolle wurde der obere Teil des SDS-PA-Gels mit Coomassie-Brilliantblau gefärbt, während der untere Teil für den Western Blot verwendet wurde. Als Kontrolle wurden 4 µg (4) bzw. 2 µg (2) Gesamtprotein aus dem basalen Segment der Wildtyp-Pflanzen, die im Schwachlicht angezogen wurden, aufgetragen. **B** Densitometrische Auswertung der immunologischen Detektion von HvWHIRLY1 in W1-1 mit dem Programm ImageJ. Das stärkste Signal (Mitte, SL) wurde auf 100 % gesetzt, alle anderen Signale sind dazu im Verhältnis dargestellt. SL = Schwachlicht, SL → HL = die Pflanzen wurden am sechsten Tag für einen Tag aus dem Schwach- ins Hochlicht überführt, HL = Hochlicht, B = basales Blattsegment, M = mittleres Blattsegment, S = Spitzensegment.

Wie zuvor gezeigt, ist in 16 µg Gesamtproteinextrakt der Linie W1-7 immunologisch kein HvWHIRLY1-Protein nachweisbar (Kapitel 3.1.2, Tab. 11). Um dennoch eventuelle Spuren des Proteins detektieren zu können, wurde die auf das SDS-PA-Gel aufgetragene Menge an Gesamtproteinextrakten im Vergleich zu den Wildtypproben auf das Doppelte erhöht. Durch die Erhöhung der Gesamtproteinextrakte war es möglich geringe Mengen des HvWHIRLY1-Proteins in W1-7 nachzuweisen. Trotz der stark reduzierten Menge des HvWHIRLY1-Proteins sind die entwicklungsabhängigen Schwankungen des Proteins auch in W1-7 zu sehen (Abb. 45A). So nimmt die Konzentration vom basalen zum mittleren Blattsegment zu und sinkt danach wieder ab. Das meiste HvWHIRLY1-Protein ist auch hier in den Segmenten von Primärblättern nach Anzucht der Pflanzen im Schwachlicht nachweisbar. Zudem ist die Menge im Spitzensegment geringer als in der Blattbasis, wie bereits für W1-1

beobachtet werden konnte. Darüber hinaus sind wie bei W1-1 keine Unterschiede in der Menge an HvWHIRLY1 zwischen vergleichbaren Segmenten von Pflanzen, deren Anzucht im Hochlicht erfolgte bzw. die ins Hochlicht transferiert wurden, zu erkennen (Abb. 45B). Im Unterschied zu Segmenten von Pflanzen, die im Schwachlicht angezogen wurden, sind in den Segmenten von Pflanzen, die im Hochlicht kultiviert bzw. ins Hochlicht überführt wurden, nur noch Spuren von HvWHIRLY1 detektierbar.

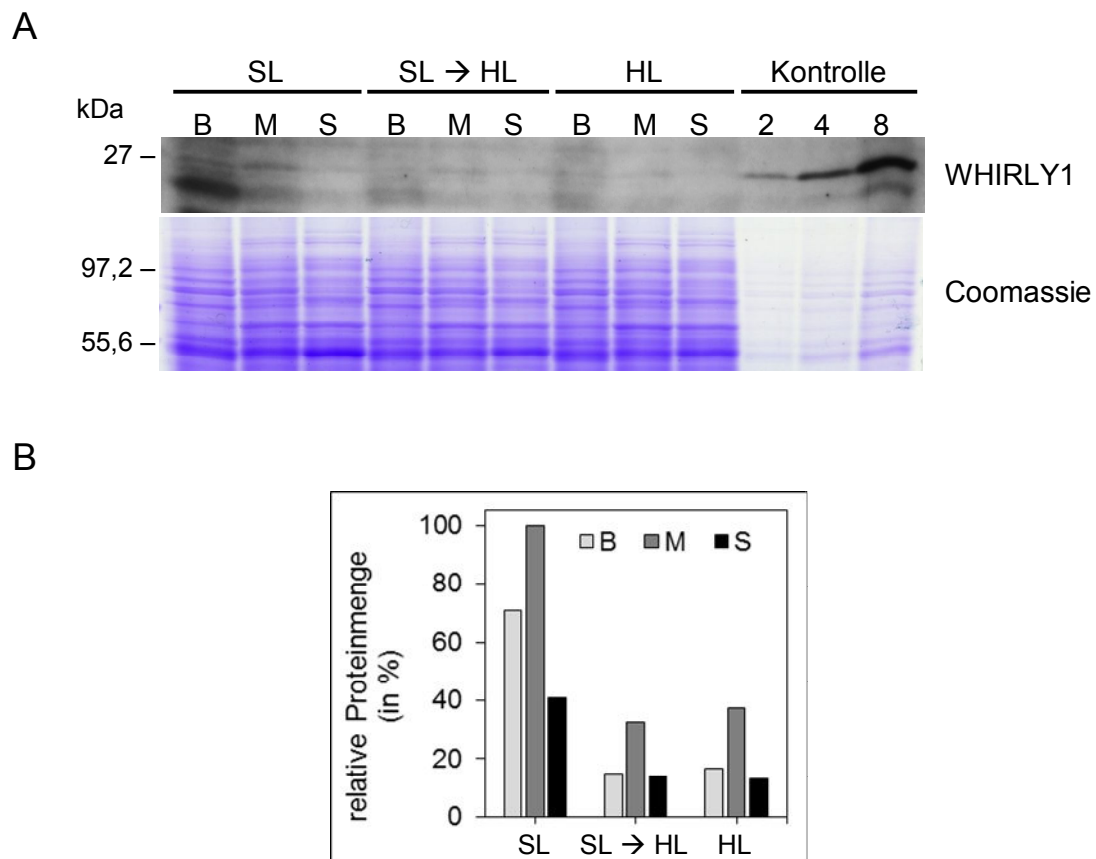


Abb. 45: Entwicklungsabhängige Veränderungen der HvWHIRLY1-Proteinmenge in sieben Tage alten Primärblättern der WHIRLY1-RNAi-Linie 7 (W1-7) nach Anzucht in unterschiedlichen Lichtintensitäten.

A Von jeder Probe wurden 30 µg Gesamtproteinextrakt auf einem SDS-PA-Gel aufgetragen. Zur Detektion wurde der Antikörper gegen HvWHIRLY1 eingesetzt. Als Beladungskontrolle wurde der obere Teil des SDS-PA-Gels mit Coomassie-Brilliantblau gefärbt, während der untere Teil für den Western Blot verwendet wurde. Als Kontrolle wurden 2 µg (2), 4 µg (4) bzw. 8 µg (8) Gesamtprotein aus dem basalen Segment der Wildtyp-Pflanzen, die im Schwachlicht angezogen wurden, aufgetragen. **B** Densitometrische Auswertung der immunologischen Detektion von HvWHIRLY1 in W1-7 mit dem Programm ImageJ. Das stärkste Signal (Mitte, SL) wurde auf 100 % gesetzt, alle anderen Signale sind dazu im Verhältnis dargestellt. SL = Schwachlicht, SL → HL = die Pflanzen wurden am sechsten Tag für einen Tag aus dem Schwach- ins Hochlicht überführt, HL = Hochlicht, B = basales Blattsegment, M = mittleres Blattsegment, S = Spitzensegment.

Die immunologischen Analysen zeigen, dass die charakteristischen Schwankungen in der Menge von HvWHIRLY1 während der Entwicklung sowohl im Wildtyp als auch in den beiden WHIRLY1-RNAi-Linien zu beobachten sind, wobei in den Segmenten der Pflanzen, die im Schwachlicht angezogen wurden, jeweils am meisten HvWHIRLY1-Protein nachweisbar ist.

Eine Anzucht im Hochlicht oder der Transfer der Pflanzen für einen Tag ins Hochlicht, führt im Wildtyp und in den RNAi-Linien zu einer deutlichen Abnahme der HvWHIRLY1-Proteinmenge.

3.3.2 Auswirkungen von unterschiedlichen Lichtintensitäten auf den plastidären DNA-Gehalt und die Struktur der Nukleotide

Zur Untersuchung der Frage, ob die verringerte HvWHIRLY1-Proteinmenge nach Anzucht der Pflanzen im Hochlicht und nach dem Transfer der Pflanzen für einen Tag aus dem Schwach- ins Hochlicht Auswirkungen auf den ptDNA-Gehalt hat, wurde gDNA aus den basalen und apikalen Segmenten von sieben Tage alten Primärblättern des Wildtyps, der Linie W1-1 und der Linie W1-7 isoliert (2.3.10) und für eine qPCR (2.3.11.2) verwendet. Wie in Kapitel 3.1.2 wurde die qPCR mit spezifischen Oligonukleotiden für die nukleären Gene *18S rDNA* und *RBCS* sowie das plastidäre Gen *petD* durchgeführt. Der ermittelte DNA-Gehalt im Kern und in den Plastiden ist im Verhältnis zur DNA-Menge im basalen Segment des Wildtyps nach Anzucht im Schwachlicht dargestellt. Weder in der Blattbasis noch in der -spitze des Wildtyps sind Unterschiede in der ptDNA-Menge zwischen den drei untersuchten Lichtbedingungen messbar (Abb. 46). Der ptDNA-Gehalt nimmt in allen Lichtbedingungen von der Blattbasis zur -spitze um etwa 200 % zu. In W1-1 können ebenfalls keine lichtabhängigen Veränderungen in der ptDNA-Menge zwischen den Spitzensegmenten bzw. den basalen Blattsegmenten beobachtet werden. Im Vergleich zur Blattspitze des Wildtyps ist in allen drei Lichtbedingungen doppelt so viel ptDNA in W1-1 messbar. Während die Anzucht im Hochlicht bzw. der Transfer der Pflanzen ins Hochlicht im Wildtyp und in W1-1 keine Veränderungen in der ptDNA-Menge in vergleichbaren Segmenten bewirkt, sind in W1-7 sowohl innerhalb der Blattbasis als auch innerhalb der Blattspitze Auswirkungen der höheren Lichtintensitäten auf die ptDNA-Menge nachweisbar. Im basalen Segment der Linie W1-7 führt die Anzucht der Pflanzen im Hochlicht zur Erhöhung der ptDNA-Menge um 70 %. Der Transfer ins Hochlicht bewirkt eine Steigerung um 90 % im Vergleich zum ptDNA-Gehalt in der Blattbasis von Pflanzen, die im Schwachlicht kultiviert wurden. In der Blattspitze wird diese Tendenz noch deutlicher. Im Schwachlicht nimmt der ptDNA-Gehalt um 100 % im Vergleich zum Wildtyp zu, während einen Tag nach dem Transfer der Pflanzen aus dem Schwach- ins Hochlicht eine Erhöhung der ptDNA-Menge um 220 % zu verzeichnen ist. Im Unterschied dazu steigt der ptDNA-Gehalt im Hochlicht nur um 130 % an. Sowohl in der Blattspitze als auch in der Blattbasis führt der Transfer der Pflanzen ins Hochlicht somit zur größten Zunahme der ptDNA, während der ptDNA-Gehalt im Hochlicht zwischen den Werten des Schwachlichts und des Transfers liegt.

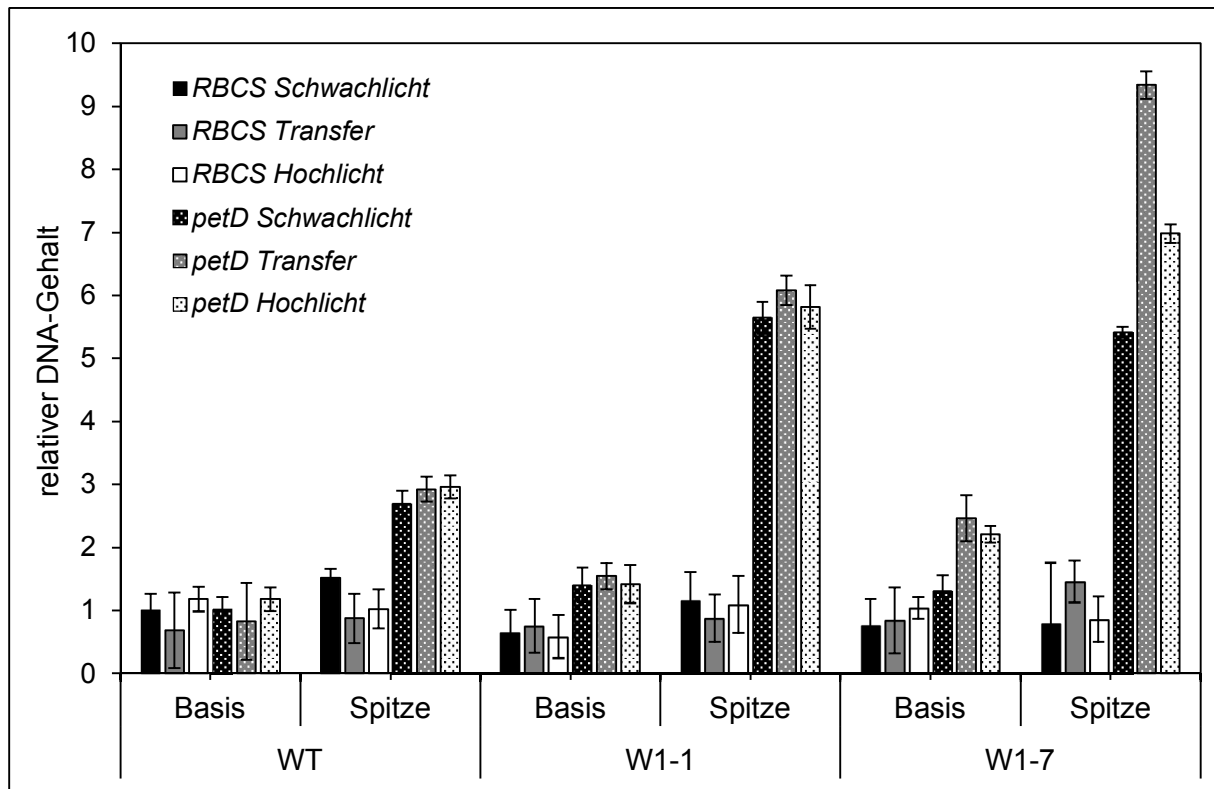


Abb. 46: Bestimmung des relativen DNA-Gehalts in basalen und apikalen Segmenten von sieben Tage alten Primärblättern des Wildtyps (WT), der WHIRLY1-RNAi-Linien 1 (W1-1) und 7 (W1-7).

Die qPCR wurde mit gDNA aus dem basalen (Basis) und apikalen (Spitze) Segment von sieben Tage alten Primärblättern des Wildtyps und der Linien W1-1 und W1-7, die in unterschiedlichen Lichtintensitäten angezogen wurden, durchgeführt. Es wurden spezifische Oligonukleotide für die nukleären Gene *18S rDNA* und *RBCS* sowie für das plastidäre Gen *petD* verwendet. Die Werte wurden auf die *18S rDNA* normalisiert. Der DNA-Gehalt im basalen Segment des Wildtyps nach Anzucht im Schwachlicht wurde auf den Wert 1 normiert, die anderen Werte sind im Verhältnis dazu dargestellt. Die Standardabweichungen wurden basierend auf drei technischen Replikaten berechnet.

Um den Einfluss von unterschiedlichen Lichtintensitäten auf die Struktur der Nukleole zu untersuchen, wurden Querschnitte des basalen (Basis) und apikalen Blattsegmentes (Spitze) von sieben Tage alten Primärblättern des Wildtyps und der WHIRLY1-RNAi-Linien 1 und 7 angefertigt und zur Visualisierung der Nukleole mit dem Fluoreszenzfarbstoff YO-PRO®-1 behandelt (2.3.15). Die Nukleoidmorphologie wurde am Konfokalmikroskop (2.3.16) dokumentiert.

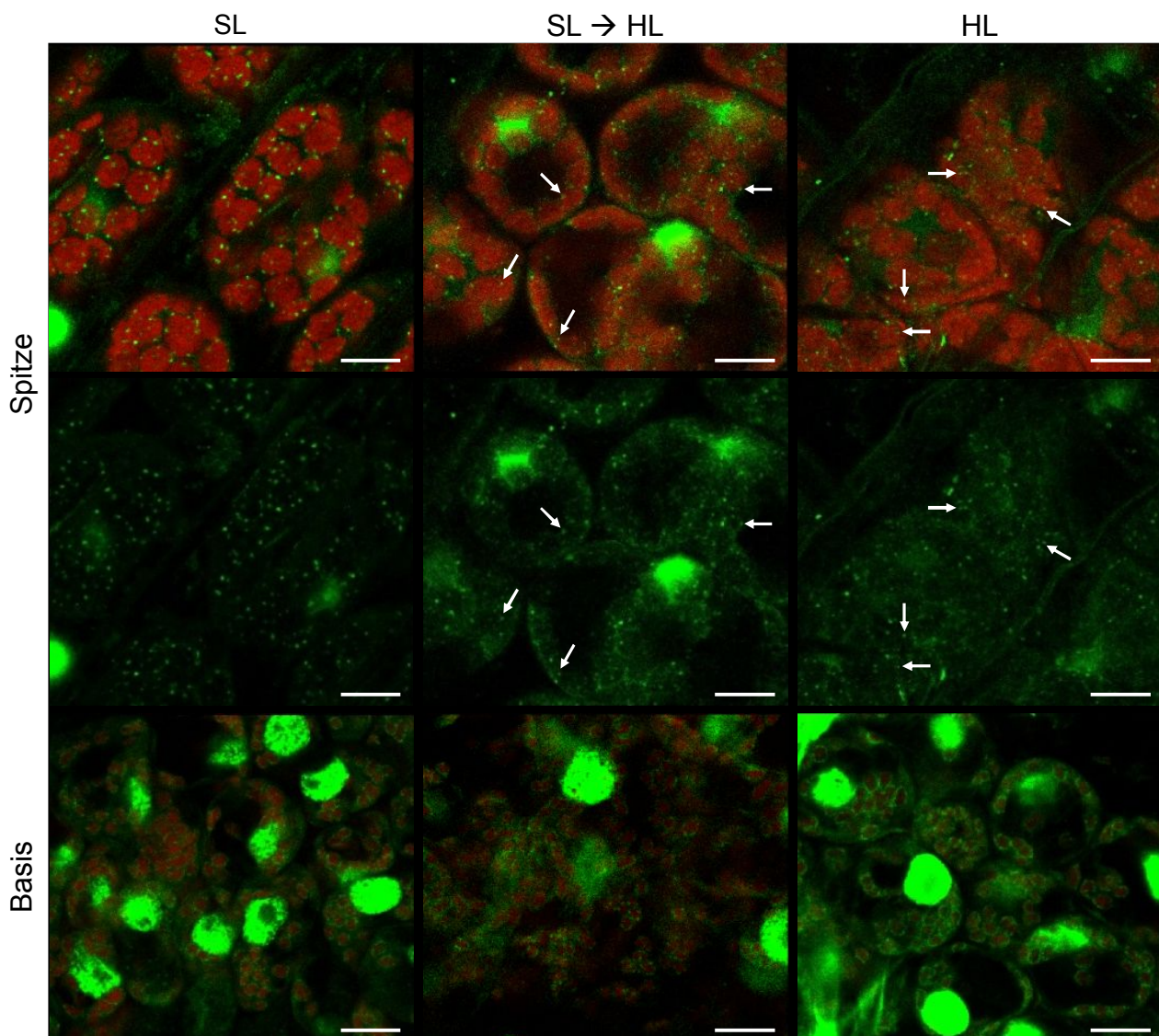


Abb. 47: Morphologie plastidärer Nukleole in apikalen und basalen Segmenten von Primärblättern des Wildtyps nach Anzucht in unterschiedlichen Lichtintensitäten.

Die Querschnitte wurden in der Blattspitze (Spitze) und der Blattbasis (Basis) von sieben Tage alten Primärblättern angefertigt. Die Färbung mit YO-PRO®-1 erfolgte an fixierten Blattquerschnitten. Die Fluoreszenz der mit YO-PRO®-1 angefärbten DNA ist in grün und die Autofluoreszenz des Chlorophylls ist in rot dargestellt. Für das Spitzensegment ist in der oberen Reihe die Überlagerung beider Fluoreszenzen und in der mittleren Reihe die Fluoreszenz der DNA dargestellt. Für die Blattbasis ist in der unteren Reihe die Überlagerung der Chlorophyllfluoreszenz und der Fluoreszenz der DNA dargestellt. Verkleinerte Nukleole sind mit Pfeilen (→) markiert. SL = Schwachlicht, SL → HL = die Pflanzen wurden am sechsten Tag für einen Tag aus dem Schwach- ins Hochlicht überführt, HL = Hochlicht, Messbalken = 10 µm

Wie bereits in Kapitel 3.1.2 gezeigt wurde, sind die Nukleole in der Blattspitze des Wildtyps nach Anzucht im Schwachlicht als kleine punktförmige Strukturen erkennbar (Abb. 47). Durch den Transfer der Pflanzen für einen Tag ins Hochlicht oder eine dauerhafte Anzucht im Hochlicht sind tendenziell kleinere Nukleole (siehe Pfeile in Abb. 47) und diffuse YO-PRO®-1-Signale zu beobachten. Außerdem sind deutlich weniger diskrete Nukleole zu erkennen. Es scheint so, als seien die Nukleole nach dem Transfer der Pflanzen ins

Hochlicht bzw. nach der kontinuierlichen Anzucht im Hochlicht schlechter anfärbbar, obwohl der ptDNA-Gehalt unter diesen Bedingungen nicht verändert ist (siehe Abb. 46). Dies deutet auf eine reduzierte Verpackung der Nukleoide bei hohen Lichtintensitäten hin. Die Aufnahmen von der Blattbasis des Wildtyps nach Anzucht unter den drei Lichtintensitäten lassen anhand der Chlorophyllautofluoreszenz erkennen, dass es sich bei den Plastiden bereits um junge Chloroplasten handelt. In allen drei Lichtbedingungen sind die Nukleoide ringförmig an der inneren Hüllmembran der Plastiden lokalisiert. Es sind keine lichtabhängigen Veränderungen der Nukleoide zu beobachten.

In Kapitel 3.1.2 wurde bereits beschrieben, dass in der Blattspitze der Linie W1-1 im Schwachlicht zwei unterschiedliche Nukleoidpopulationen, kleine für den Wildtyp typische und vergrößerte Nukleoide, zu erkennen sind (siehe auch Abb. 48). Wie im Wildtyp sind die Nukleoide nach dem Transfer ins Hochlicht eher kleiner und schwächer angefärbt als nach einer Anzucht im Schwachlicht (siehe Pfeile in Abb. 48). Diffuse Signale sind ebenfalls zu sehen. Nach einer Anzucht der Pflanzen im Hochlicht sind die Nukleoide im Vergleich zu den beiden anderen Lichtbedingungen deutlich vergrößert (siehe Pfeilspitzen in Abb. 48). Sowohl der Transfer ins Hochlicht als auch die dauerhafte Anzucht im Hochlicht führen zu einer schwächeren Färbung der Nukleoide mit YO-PRO®-1, obwohl es keine lichtabhängigen Veränderungen des ptDNA-Gehalts in den Spitzensegmenten der Linie W1-1 gibt (Abb. 46). In der Blattbasis der Linie W1-1 sind die Nukleoide von Pflanzen, die im Schwachlicht angezogen wurden, ringförmig bzw. in Form einer Perlenkette an der Hüllmembran zu erkennen (Abb. 48). Nach dem Transfer der Pflanzen für einen Tag ins Hochlicht sind die Nukleoide als ringförmige Strukturen und nach siebentägiger Anzucht im Hochlicht punktförmig an der inneren Hüllmembran organisiert. Wie zuvor im Wildtyp scheinen keine lichtabhängigen Veränderungen der Nukleoide vorhanden zu sein.

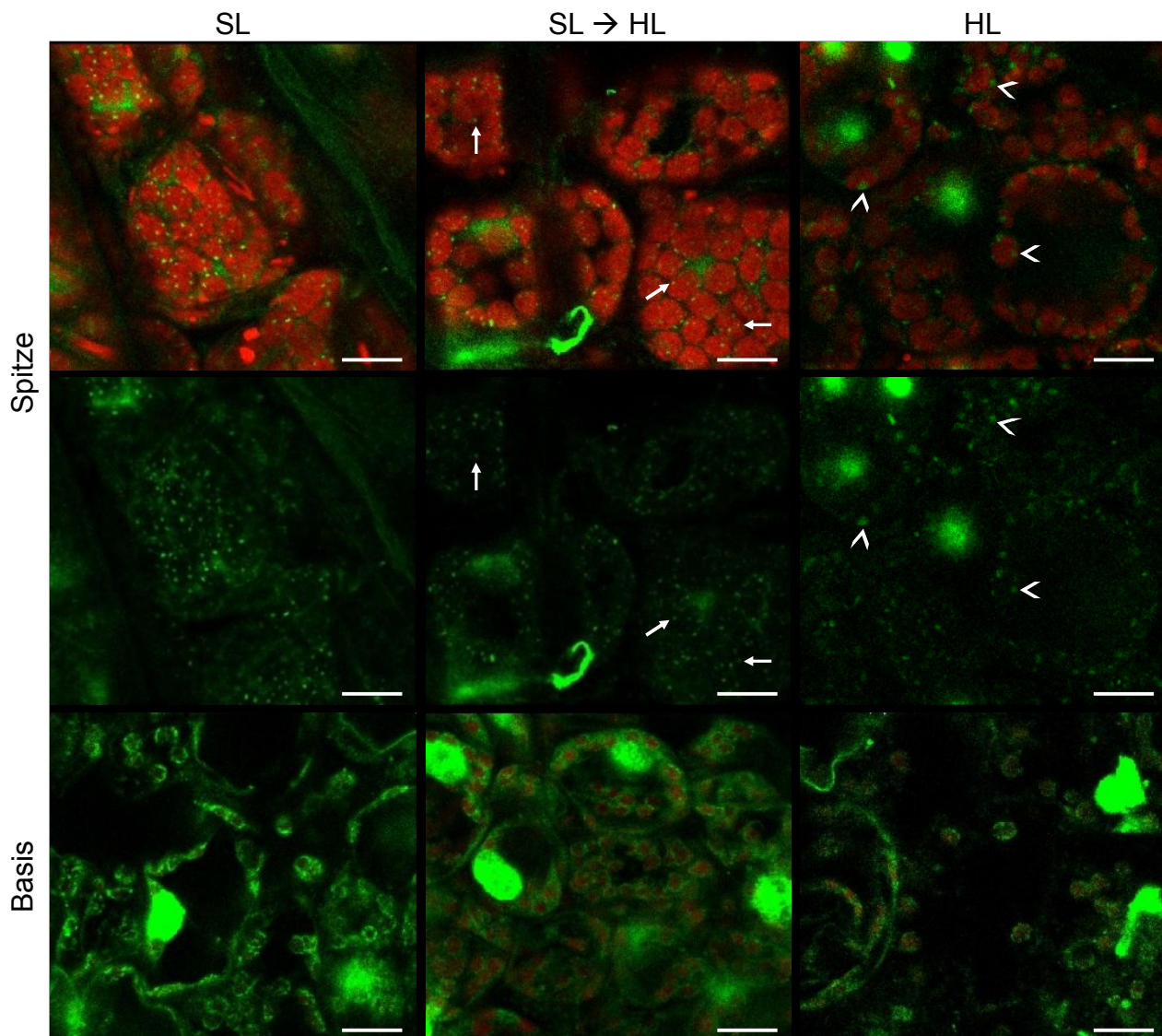


Abb. 48: Morphologie plastidärer Nukleole in apikalen und basalen Segmenten von Primärblättern der WHIRLY1-RNAi-Linie 1 (W1-1) nach Anzucht in unterschiedlichen Lichtintensitäten.

Die Querschnitte wurden in der Blattspitze (Spitze) und der Blattbasis (Basis) von sieben Tage alten Primärblättern angefertigt. Die Färbung mit YO-PRO®-1 erfolgte an fixierten Blattquerschnitten. Die Fluoreszenz der mit YO-PRO®-1 angefärbten DNA ist in grün und die Autofluoreszenz des Chlorophylls ist in rot dargestellt. Für das Spitzensegment ist in der oberen Reihe die Überlagerung beider Fluoreszenzen und in der mittleren Reihe die Fluoreszenz der DNA dargestellt. Für die Blattbasis ist in der unteren Reihe die Überlagerung der Chlorophyllfluoreszenz und der Fluoreszenz der DNA dargestellt. Verkleinerte Nukleole sind mit Pfeilen (→) und vergrößerte Nukleole sind mit Pfeilspitzen (>) markiert. SL = Schwachlicht, SL → HL = die Pflanzen wurden am sechsten Tag für einen Tag aus dem Schwach- ins Hochlicht überführt, HL = Hochlicht, Messbalken = 10 µm.

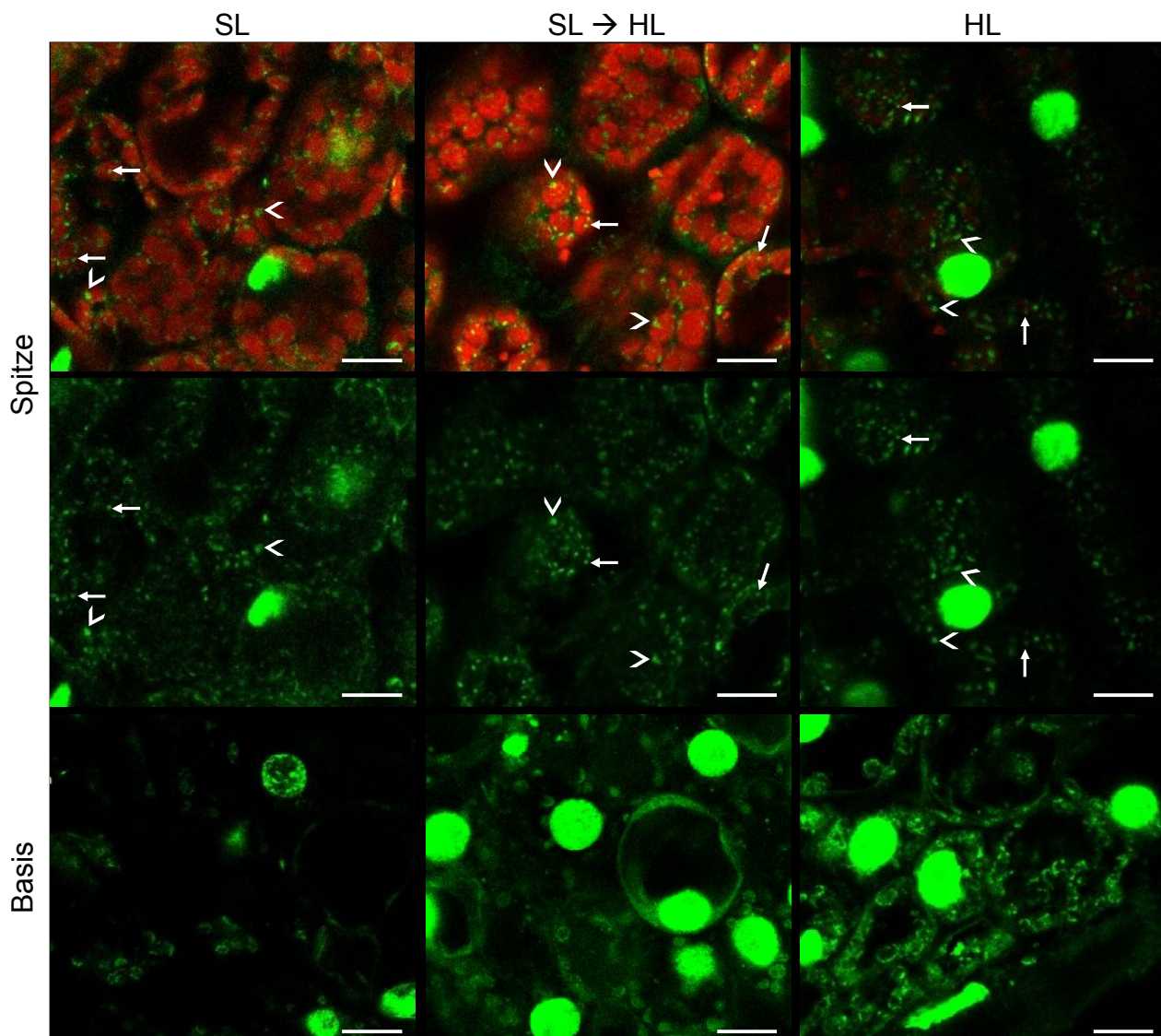


Abb. 49: Morphologie plastidärer Nukleole in apikalen und basalen Segmenten von Primärblättern der WHIRLY1-RNAi-Linie 7 (W1-7) nach Anzucht in unterschiedlichen Lichtintensitäten.

Die Querschnitte wurden in der Blattspitze (Spitze) und der Blattbasis (Basis) von sieben Tage alten Primärblättern angefertigt. Die Färbung mit YO-PRO®-1 erfolgte an fixierten Blattquerschnitten. Die Fluoreszenz der mit YO-PRO®-1 angefärbten DNA ist in grün und die Autofluoreszenz des Chlorophylls ist in rot dargestellt. Für das Spitzensegment ist in der oberen Reihe die Überlagerung beider Fluoreszenzen und in der mittleren Reihe die Fluoreszenz der DNA dargestellt. Für die Blattbasis ist in der unteren Reihe die Fluoreszenz der DNA dargestellt. Kleine für den Wildtyp typische Nukleole sind mit Pfeilen (→) und vergrößerte Nukleole sind mit Pfeilspitzen (>) markiert. SL = Schwachlicht, SL → HL = die Pflanzen wurden am sechsten Tag für einen Tag aus dem Schwach- ins Hochlicht überführt, HL = Hochlicht, Messbalken = 10 µm.

In der Linie W1-7 sind die Nukleole im Spitzensegment des Gerstenprimärblattes, wie im Kapitel 3.1.2 gezeigt, zum einen in Form von kleinen runden Nukleolen wie im Wildtyp (siehe Pfeile in Abb. 49) und zum anderen als deutlich vergrößerte Nukleole sichtbar, wobei die großen Nukleole eine ungleichmäßige Struktur aufweisen (siehe Pfeilspitzen in Abb. 49). Anders als im Wildtyp und in W1-1 scheint der Transfer ins Hochlicht und die Anzucht im kontinuierlichen Hochlicht zu keiner deutlichen strukturellen Veränderung der Nukleole zu

führen. Es sind nach wie vor die beiden Nukleoidpopulationen zu erkennen und die Nukleioide sind wie nach der Anzucht im Schwachlicht gut anfärbbar. Durch eine Anzucht der Linie W1-7 im Hochlicht ist wie bei der Linie W1-1 eine schwächere Chlorophyllautofluoreszenz in der Blattspitze zu erkennen, was mit der beobachteten Aufhellung der Primärblätter (Kapitel 3.3.1, Abb. 42) einhergeht und auf eine photooxidative Schädigung hindeutet. In der Blattbasis sind die Nukleioide, wie für den Wildtyp und die Linie W1-1 zu beobachten war, an der Hüllmembran teilweise ringförmig und teilweise in Form einer Perlenkette angeordnet. Sowohl nach dem Transfer als auch nach der Anzucht im Hochlicht sind deutlich mehr YO-PRO®-1-Signale in einer Zelle zu erkennen, was mit der erhöhten Menge an ptDNA einhergeht (Abb. 46).

Die mikroskopischen Untersuchungen zur Morphologie der plastidären Nukleioide zeigen, dass die Nukleioide bei höherer Lichtintensität in der Blattspitze des Wildtyps und in der Linie W1-1 schwieriger zu visualisieren sind. Zum einen sind weniger sowie kleinere Nukleioide und zum anderen diffusere Fluoreszenzsignale detektierbar. Diese Veränderungen gehen mit der Abnahme der HvWHIRLY1-Proteinmenge bei höherer Lichtintensität einher. In der Blattbasis sind sowohl beim Wildtyp als auch bei der Linie W1-1 in den unterschiedlichen Lichtbedingungen keine Veränderungen in der Signalstärke der Nukleioide zu beobachten. Bei der Linie W1-7 sind keine lichtabhängigen morphologischen Veränderungen im Spitzensegment zu erkennen. Die vergrößerten aber auch die kleinen für den Wildtyp typischen Nukleioide sind in allen Lichtbedingungen gut nachweisbar. Anders als im Wildtyp und in W1-1 scheint die Abnahme der HvWHIRLY1-Proteinmenge mit steigender Lichtintensität keinen Einfluss auf die Nukleoidstruktur zu haben. Allerdings sind im basalen Blattsegment der Linie W1-7 sowohl stärkere als auch mehr Nukleoidsignale im Hochlicht und nach dem Transfer zu erkennen, was mit der reduzierten Menge an HvWHIRLY1 und der erhöhten ptDNA-Menge in der Blattbasis bei höherer Lichtintensität einhergeht. Darüber hinaus sind sowohl in W1-1 als auch in W1-7 nach der Anzucht im Hochlicht deutlich schwächere Chlorophyllfluoreszenzsignale in den Querschnitten zu detektieren als in den beiden anderen Lichtbedingungen, was mit der Aufhellung der Primärblätter im Hochlicht einhergeht (Kapitel 3.3.1, Abb. 42).

3.3.3 Das HvWHIRLY1-Protein in plastidären Nukleoidfraktionen

Im vorangegangenen Kapitel 3.3.1 konnte gezeigt werden, dass unterschiedliche Lichtintensitäten einen Einfluss auf die Akkumulation des HvWHIRLY1-Proteins in Gesamtproteinextrakten aus basalen, mittleren und apikalen Segmenten von Primärblättern der Gerste haben. Die Anzucht von Gerstenpflanzen im Hochlicht sowie der Transfer für einen

Tag ins Hochlicht führen im Vergleich zum Schwachlicht zu einer Reduktion in der Menge des HvWHIRLY1-Proteins. Die verringerte Menge an HvWHIRLY1-Protein geht im Wildtyp und in W1-1 zudem mit einer schlechteren Färbung plastidärer Nukleoide im Spitzensegment einher. Um zu prüfen, ob sich die HvWHIRLY1-Proteinmenge auch in den Nukleoiden in Abhängigkeit von den Lichtbedingungen ändert, wie für das Gesamtproteinextrakt gezeigt werden konnte, wurden Nukleoide aus zehn Tage alten Wildtyp Gerstenpflanzen, die im Schwach- (SL) bzw. Hochlicht (HL) angezogen worden sind, isoliert (2.4.5). Die für die Nukleoidisolierung eingesetzten Chloroplasten (C), der Überstand nach dem Aufschluss der Chloroplasten (Ü1a) und die beiden Nukleoidfraktionen N1 und N2 wurden nach der Proteinkonzentration auf einem SDS-PA-Gel aufgetrennt. Die Nukleoidfraktion 1 (N1) wurde dabei durch eine Zentrifugation nach Aufschluss der Chloroplasten und die reinere Nukleoidfraktion 2 (N2) nach zwei weiteren Zentrifugationsschritten erhalten (2.4.5). Die im SDS-PA-Gel aufgetrennten Proteinproben (2.4.8) wurden auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert (2.4.10) und zur immunologischen Untersuchung mit dem α -HvWHIRLY1-Antikörper und mit einem Antikörper gegen das nukleoidassoziierte Protein TCP34 inkubiert (2.4.12).

WHIRLY1 ist unter Verwendung des α -HvWHIRLY1-Antikörpers in allen Proben auf der bekannten Höhe von 25 kDa detektierbar (Abb. 50). Auffällig ist, dass neben der 25 kDa Bande weitere Banden mit unterschiedlichen Molekulargewichten nachweisbar sind. So sind in den Chloroplasten (C) zwei zusätzliche Banden bei 35 kDa sowie eine weitere bei 60 kDa zu erkennen. In den Überständen (Ü1a) und den Nukleoidfraktionen (N1 und N2) ist jeweils eine weitere Bande bei etwa 55 kDa nachweisbar und in den Nukleoiden aus dem Schwachlicht zudem mehrere weitere Banden bei über 70 kDa sowie bei etwa 20 kDa. Vergleicht man die HvWHIRLY1-Proteinmenge in den Chloroplasten (C) aus dem Schwachlicht mit denen aus dem Hochlicht, fällt auf, dass die Chloroplasten in niedrigen Lichtintensitäten mehr HvWHIRLY1-Protein enthalten. Während die HvWHIRLY1-Bande bei 25 kDa im Hochlicht deutlich abnimmt, ändert sich die Intensität der beiden Banden bei 35 kDa mit steigender Lichtintensität kaum. In den Überständen nach Aufschluss der Chloroplasten (Ü1a), die nach der Sedimentation der Nukleoide erhalten wurden, sind kleine Mengen des HvWHIRLY1-Proteins nachweisbar. Wie die Chloroplasten enthält der Überstand aus dem Hochlicht im Vergleich zu dem des Schwachlichts weniger HvWHIRLY1-Protein. Die unterschiedliche Akkumulation des HvWHIRLY1-Proteins in den beiden untersuchten Lichtbedingungen wird außerdem in den Nukleoidfraktionen (N1 und N2) deutlich. Im Schwachlicht enthält die Nukleoidfraktion 1 (N1) doppelt bis dreimal so viel HvWHIRLY1 als im Hochlicht. Auch die zweite Proteinbande bei 55 kDa ist im Schwachlicht deutlich stärker ausgeprägt als im Hochlicht. In den noch weiter aufgereinigten Nukleoidfraktionen 2 (N2) ist eine noch größere Menge an HvWHIRLY1 nachweisbar als in den

Nukleoidfraktionen 1. Außerdem wird der Unterschied zwischen der HvWHIRLY1-Proteinmenge im Schwach- und Hochlicht in der Nukleoidfraktion 2 noch deutlicher. So sind sowohl die 25 kDa als auch die 55 kDa Proteinbande in der Nukleoidfraktion 2 im Schwachlicht im Vergleich zum Hochlicht angereichert. Durch den weiteren Aufreinigungsschritt der Nukleide werden außerdem weitere Proteinbanden oberhalb von 70 kDa sichtbar, welche nach Anzucht im Schwachlicht deutlicher detektierbar sind als im Hochlicht.

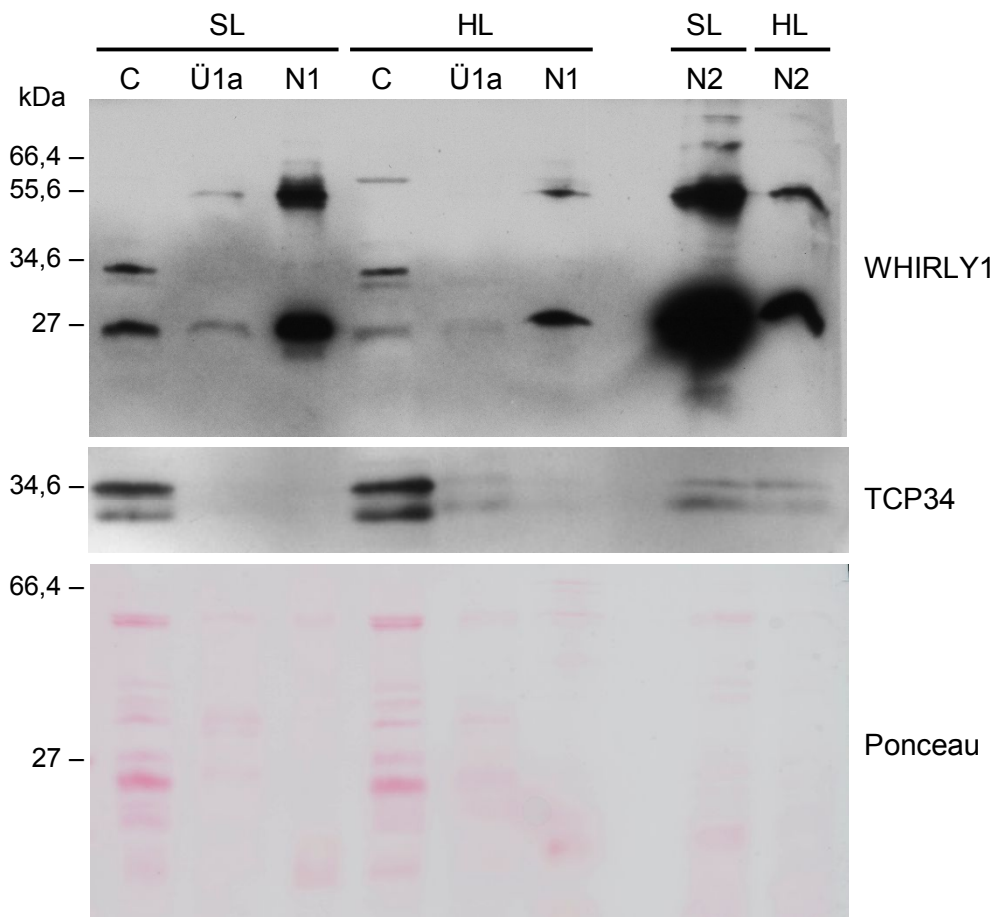


Abb. 50: Immunologische Analyse von Nukleoiden aus 10 Tage alten Wildtyp Gerstenpflanzen nach Anzucht im Schwach- bzw. Hochlicht.

Es wurden gleiche Proteinmengen der Chloroplasten (C), der Überstände (Ü1a) sowie der beiden Nukleoidfraktionen 1 (N1) und 2 (N2) aus dem Schwachlicht (SL) bzw. Hochlicht (HL) auf ein 14 %iges SDS-PAGE aufgetragen. Die Detektion erfolgte mit Antikörpern gegen HvWHIRLY1 und TCP34. Zur Kontrolle des Proteingehalts wurde die Membran vor der Detektion mit Ponceau S gefärbt.

Zur immunologischen Untersuchung der Nukleide wurde zudem ein Antikörper gegen das nukleoidassoziierte Protein TCP34 verwendet. Der Nachweis von TCP34 zeigt zwei Banden, eine auf Höhe der 34,6 kDa Markerbande und eine Bande etwas darunter. Die beiden Banden werden auf eine unterschiedliche Prozessierung des N-terminalen Proteinbereichs zurückgeführt (Weber et al. 2006). Das stärkste Signal kann in den Chloroplasten detektiert werden, wobei im Hochlicht beide Banden in den Chloroplasten stärker akkumulieren als im

Schwachlicht. In der Nukleoidfraktion 1 aus dem Schwach- und dem Hochlicht sind beide Banden nur in Spuren nachweisbar, wohingegen sie in der Nukleoidfraktion 2 unter beiden Lichtbedingungen angereichert werden konnten. Während in den Chloroplasten die untere Proteinbande schwächer ist als die obere, ist in den Nukleoidfraktionen 2 die untere Bande prägnanter.

Um zu zeigen, dass sich das Verhältnis vom HvWHIRLY1-Protein zum ptDNA-Gehalt im Hochlicht ändert, wurde die DNA-Konzentration in der Nukleoidfraktion 1 aus dem Schwach- bzw. Hochlicht sowohl auf einem Agarosegel (Anhang, Abb. 68) als auch immunologisch unter Verwendung eines α -DNA-Antikörpers bestimmt (2.4.12 und Abb. 51A). Die immunologische Untersuchung zeigt, dass in den Nukleoidfraktionen 1 aus dem Schwachlicht (SL) und dem Hochlicht (HL) gleiche Mengen an ptDNA auf der Nitrozellulose-Membran immobilisiert wurden (Abb. 51A). Vergleichbare Membranen wurden für die Immundetektion von HvWHIRLY1 (Abb. 51B), MFP1, TCP34 und pTAC12 (Abb. 51C) sowie PsbA und LHCB1 (Abb. 51D) verwendet.

Der immunologische Nachweis des HvWHIRLY1-Proteins zeigt, dass die Nukleoide bezogen auf die DNA-Menge im Hochlicht deutlich weniger der 25 kDa und der 55 kDa Form des HvWHIRLY1-Proteins aufweisen als im Schwachlicht (Abb. 51B). Hochlicht führt demnach zu einer Abnahme der HvWHIRLY1-Proteinmenge in den Nukleoiden sowohl in Bezug auf die Proteinkonzentration (Abb. 50) als auch in Bezug auf den ptDNA-Gehalt (Abb. 51). Unter Verwendung des α -MFP1-Antikörpers wurden zwei Banden bei etwa 80 kDa und 66 kDa detektiert. Während es sich bei der 80 kDa großen Bande um MFP1 handelt, stellt die 66 kDa große Form ein Abbauprodukt des MFP1-Proteins dar (Jeong et al. 2003). Die Intensität der beiden Banden kehrt sich durch veränderte Lichtbedingungen um (Abb. 51C). Während die Nukleoidfraktion im Schwachlicht mehr MFP1 enthält, ist das Abbauprodukt verstärkt im Hochlicht detektierbar. Das zweite untersuchte ptNAP, TCP34, zeigt anders als HvWHIRLY1 eine Zunahme in der Menge bei hoher Lichtintensität (Abb. 51C). Im Unterschied zur zuvor gezeigten immunologischen Untersuchung mit Bezug zur Proteinkonzentration (Abb. 50), sind bei Bezug zum ptDNA-Gehalt deutlichere Signale für TCP34 nachweisbar, was auf unterschiedliche Expositionszeiten der Röntgenfilme während der Detektion zurückzuführen ist. Im Unterschied zu den Nukleoidfraktionen 2 (Abb. 50), ist in den Nukleoidfraktionen 1 die 35 kDa große Bande stärker als die niedermolekulare Proteinbande nachweisbar (Abb. 51C). Ein weiteres ptNAP, das immunologisch untersucht wurde ist pTAC12, eine Komponente der plastidär kodierten RNA Polymerase (PEP). Im Unterschied zu HvWHIRLY1, MFP1 und TCP34 ist für pTAC12 keine lichtabhängige Veränderung der Menge in den Nukleoidfraktionen detektierbar (Abb. 51C).

Um darüber hinaus zu überprüfen, ob die Nukleide Verunreinigungen des Photosyntheseapparates enthielten, erfolgte der immunologische Nachweis von PsbA und LHCB1. PsbA, welches Teil des Reaktionszentrums des Photosystems II und in der Thylakoidmembran lokalisiert ist, kann in den Nukleiden nicht nachgewiesen werden (Abb. 51D). Im Unterschied dazu ist LHCB1 in beiden Nukleidfractionen detektierbar, wobei die Nukleide im Hochlicht mehr LHCB1 enthalten als im Schwachlicht (Abb. 51D). LHCB1 ist als Komponente des Lichtsammelkomplexes II (LHCII, *light harvesting complex II*) an der Absorption des Lichts am Photosystem II beteiligt.

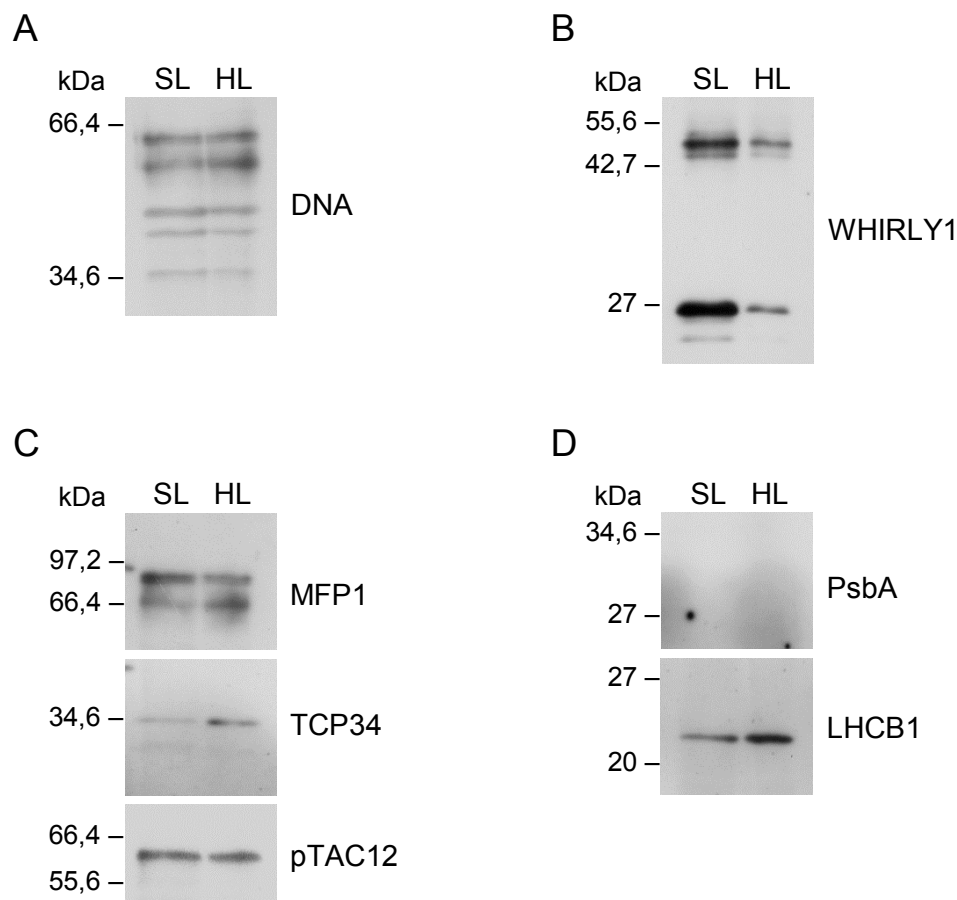


Abb. 51: Immunologische Analyse von Nukleiden aus 10 Tage alten Wildtyp Gerstenpflanzen nach Anzucht im Schwach- bzw. Hochlicht bezogen auf den DNA-Gehalt.

Die Nukleidfraction 1 aus dem Schwachlicht (SL) bzw. Hochlicht (HL) wurde gemäß des DNA-Gehalts auf einem 14 %igen SDS-PA-Gel aufgetrennt. Nach der Immobilisierung der Proteine auf einer Nitrozellulose-Membran erfolgte der immunologische Nachweis von **A**: DNA, **B**: WHIRLY1, **C**: MFP1, TCP34 und pTAC12 sowie **D**: PsbA und LHCB1.

4 Diskussion

4.1 Die Kompaktierungsaktivität von WHIRLY-Proteinen

Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Funktion des WHIRLY1-Proteins in den plastidären Nukleoiden der Gerste aufzuklären. Die mikroskopischen Untersuchungen der Nukleoide zeigten, dass in den Chloroplasten der WHIRLY1-RNAi-Linien 1 und 7 neben den kleinen für den Wildtyp typischen Nukleoiden zusätzlich deutlich vergrößerte Nukleoide zu erkennen sind (siehe 3.1.2). Die vergrößerten Nukleoide bei reduzierter Menge des HvWHIRLY1-Proteins deuten auf einen geringeren Kompaktierungsgrad hin. Diese Vermutung konnte zudem durch transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen, die große Bereiche von locker organisierter DNA zeigen, bestätigt werden (Krupinska et al. 2014a). Darüber hinaus ergaben die heterologen Expressionsstudien in *E. coli*, dass eine Überexpression der HvWHIRLY1-Sequenz zu einer stärkeren Kompaktierung der bakteriellen Nukleoide führt. Diese Befunde lassen den Schluss zu, dass HvWHIRLY1 ein Kompaktierungsprotein für Nukleoide ist. Um zu überprüfen, ob die Funktion als Kompaktierungsprotein bei allen plastidär lokalisierten WHIRLY-Proteinen konserviert ist, wurden sowohl das ZmWHIRLY1-Protein des Maises als auch das AtWHIRLY1- und das AtWHIRLY3-Protein von Arabidopsis in *E. coli* überproduziert. Die Expressionsstudien zeigten, dass neben HvWHIRLY1 nur das ZmWHIRLY1-Protein zur Kompaktierung von bakteriellen Nukleoiden in der Lage ist, nicht aber AtWHIRLY1 und AtWHIRLY3 (siehe 3.2.4). Die Funktion eines Kompaktierungsproteins weisen demnach nicht alle plastidären WHIRLY-Proteine auf.

4.1.1 Das PRAPP-Motiv bewirkt die Kompaktierungsaktivität des HvWHIRLY1- und des ZmWHIRLY1-Proteins

Die heterologen Expressionsanalysen und die ortsspezifische Mutagenese (eine Übersicht aller eingeführten Mutationen ist der Tab. 12 im Anhang zu entnehmen) ergaben, dass das PRAPP-Motiv am N-Terminus von HvWHIRLY1 die Kompaktierung bakterieller Nukleoide bewirkt (siehe 3.2.6). Dabei sind sowohl die Proline als auch das Arginin unerlässlich für diese Aktivität. Außerdem wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass auch das WHIRLY1-Protein des Maises die bakteriellen Nukleoide kompaktieren kann (siehe 3.2.4). Wie für HvWHIRLY1 bewirkt der Austausch des Arginins 63 gegen ein Alanin, der kleinstmöglichen Mutation innerhalb des PRAPP-Motivs, die Aufhebung der

kompaktierenden Wirkung des ZmWHIRLY1-Proteins (siehe 3.2.6). Die Überexpression der *ZmWHIRLY1*-Sequenz führt zu einem noch stärker inhibierenden Effekt auf das Wachstum der *E. coli*-Zellen als die Überexpression der *HvWHIRLY1*-Sequenz (siehe 3.2.4). Die stärkere Wirkung könnte durch die zwei weiteren Proline des ZmWHIRLY1-Proteins, welche direkt C-terminal auf das PRAPP-Motiv (PRAPPP) folgen, bewirkt werden. Proline sind auf Grund ihrer Ringstruktur nicht in der Lage flexible Konformationsänderungen einzugehen, weshalb sie häufig zu Knicks in der Proteinstruktur führen und geordnete Strukturen unterbrechen (Betts & Russell 2003). Es kann spekuliert werden, dass die Konformation des PRAPP-Motivs durch die zwei weiteren Proline die Wechselwirkung mit der DNA und damit eine stärkere Nukleoidverpackung begünstigt.

Eine Bindung des HvWHIRLY1-Proteins an DNA ist bereits ohne PRAPP-Motiv möglich. So zeigten Untersuchungen mit einem N-terminal verkürzten rekombinanten HvWHIRLY1-Protein, welches kein PRAPP-Motiv besitzt, eine schwache Interaktion mit doppelsträngiger DNA (Krupinska et al. 2014b). Mit dem vollständigen rekombinanten ZmWHIRLY1-Protein war hingegen eine deutliche Bindung an doppelsträngige DNA nachweisbar (Prikryl et al. 2008). DIP-Chip-Analysen ergaben, dass das ZmWHIRLY1-Protein ohne eine Sequenzspezifität an die *ptDNA* bindet. Deshalb kann angenommen werden, dass die Kompaktierungsaktivität des HvWHIRLY1-Proteins durch Interaktion mit doppelsträngiger DNA unabhängig von der DNA-Sequenz erfolgt, so wie es für die Chromatin-modulierenden Histone in eukaryotischen Zellkernen der Fall ist (Campos & Reinberg 2009; Li & Reinberg 2011). Eine Beteiligung von Prolinen an der strukturellen Organisation der DNA konnte auch für die beiden bakteriellen NAPs HU und IHF gezeigt werden. HU und IHF weisen eine Sequenzähnlichkeit von 30–40 % auf (Swinger et al. 2003). Beide Proteine liegen in *E. coli* in Form eines Heterodimers vor und führen zu Krümmungen der doppelsträngigen DNA, welche im Fall von HU einen Winkel von 105–140° und im Fall von IHF einen Winkel von >160° aufweisen (Rice et al. 1996; Swinger et al. 2003). Während HU unabhängig von der Sequenz an die DNA bindet, erfolgt die Bindung von IHF spezifisch an bestimmte DNA-Sequenzen. Die Interaktion von HU und IHF mit der DNA erfolgt über einen Prolinrest, welcher sich im Schleifenbereich einer β -Haarnadelstruktur (*β -hairpin*) zwischen zwei antiparallelen β -Faltblatt-Strängen befindet. Das Prolin beider Untereinheiten interkaliert dabei zwischen Basenpaare in der kleinen Furche der DNA, wodurch die DNA an diesen beiden Stellen geknickt wird, was zu einer U-förmigen Krümmung führt. Für IHF wurde darüber hinaus gezeigt, dass zwei Argininreste, welche sich zwei bzw. fünf Aminosäuren N-terminal vor dem Prolin befinden, über Wasserstoffbrückenbindungen an Basen der kleinen Furche der DNA binden (Rice et al. 1996). Die Proline des PRAPP-Motivs von HvWHIRLY1 könnten ähnlich wie die des IHF-Proteins mit der DNA interagieren, wobei das Arginin über Wasserstoffbrückenbindungen mit einzelnen Basen der DNA zu einer Stabilisierung der HvWHIRLY1-DNA-

Komplexe beitragen könnte. Innerhalb des HvWHIRLY1-Proteins befinden sich zwei weitere Arginine, die sich acht Aminosäuren N-terminal bzw. drei Aminosäuren C-terminal vom PRAPP-Motiv befinden. Diese Argininreste könnten ebenfalls mit der DNA interagieren und den entstehenden HvWHIRLY1-DNA-Komplex ähnlich wie bei IHF zusätzlich stabilisieren.

4.1.2 Vorkommen des PRAPP-Motivs innerhalb der WHIRLY-Proteinfamilie

Anders als für die beiden monokotylen WHIRLY1-Proteine von Gerste und Mais zeigte die Überexpression der *AtWHIRLY1*- bzw. der *AtWHIRLY3*-Sequenz von Arabidopsis, dass diese beiden Proteine keinen Einfluss auf die Kompaktierung bakterieller Nukleide haben (siehe 3.2.4). Im Unterschied zu den WHIRLY1-Proteinen von Gerste und Mais verfügen die plastidären WHIRLY-Proteine dikotyler Pflanzenarten über kein PRAPP-Motiv. Wurde allerdings das PRAPP-Motiv in die *AtWHIRLY1*-Proteinsequenz eingefügt, war das chimäre *AtWHIRLY1*+PRAPP-Protein in der Lage die Kompaktierung der bakteriellen Nukleide zu verändern (siehe 3.2.8). Dieses Ergebnis zeigt, dass das PRAPP-Motiv entscheidend dafür ist, ob WHIRLY-Proteine eine kompaktierende Wirkung auf die Nukleide haben oder nicht. Die Assoziation von plastidären WHIRLY-Proteinen mit der ptDNA ist jedoch unabhängig von dem PRAPP-Motiv, denn auch die plastidären WHIRLY-Proteine von Arabidopsis wurden sowohl in TAC-Fractionen als auch in Nukleoidfraktionen identifiziert (Pfalz et al. 2006; Huang et al. 2013). Für das *AtWHIRLY1*- und das *AtWHIRLY3*-Protein wird eine Funktion als Anti-Rekombinationsprotein angenommen. So gibt es in einer *whirly1/3*-Doppelmutante eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für illegitime Rekombinationen in der ptDNA, was in einigen Zellen zu einer gestörten Chloroplastenentwicklung und damit einhergehend zur Ausbildung von variierten Blättern führt (Maréchal et al. 2009; Cappadocia et al. 2010). *AtWHIRLY1* und *AtWHIRLY3* verhindern demnach das Auftreten illegitimer Rekombinationen in der ptDNA und sind damit an der Aufrechterhaltung der Genomstabilität der Plastiden beteiligt.

4.1.3 Das PRAPP-Motiv in monokotylen WHIRLY1-Proteinen

Das PRAPP-Motiv wurde in WHIRLY1-Proteinen von monokotylen Pflanzen innerhalb der Poaceae identifiziert (siehe 3.2.6). Um den Bereich, in dem sich das PRAPP-Motiv in den WHIRLY1-Proteinen der Poaceae befindet, mit den Sequenzen an vergleichbaren Positionen von anderen monokotylen WHIRLY1-Proteine zu vergleichen, wurden die zwölf bekannten WHIRLY1-Proteinsequenzen von monokotylen Arten herangezogen. Zur Verdeutlichung der Sequenzunterschiede an dieser Position sind nur die Sequenzen, die sich an der gleichen Stelle wie das PRAPP-Motiv im entsprechenden Protein befinden, dargestellt (Abb. 52). Der Vergleich zeigt, dass das PRAPP-Motiv bzw. PRAPP-ähnliche Motive innerhalb aller be-

kannten WHIRLY1-Proteine aus der monokotylen Familie der Poaceae zu finden sind. In den WHIRLY1-Proteinen der vier Arten Mais (*ZmWHY1*), *S. bicolor* (*SbWHY1*), *O. sativa* (*OsWHY1*) und *S. italica* (*SiWHY1*) folgen auf das PRAPP-Motiv C-terminal direkt zwei bis fünf weitere Proline. Wie bereits erwähnt, wäre es interessant zu untersuchen, ob die zusätzlichen Proline nach dem PRAPP-Motiv zu einer stärkeren Interaktion mit der DNA führen (siehe 4.1.1). Das PRAPP-Motiv im WHIRLY1-Protein von *B. distachyon* (*BdWHY1*) und *B. sylvaticum* (*BsWHY1*) ist durch zwei Aminosäuren unterbrochen. Ob diese PRAPP-ähnlichen Motive ebenfalls zu einer Kompaktierung der Nukleotide führen, müssen heterologe Expressionsstudien zeigen.

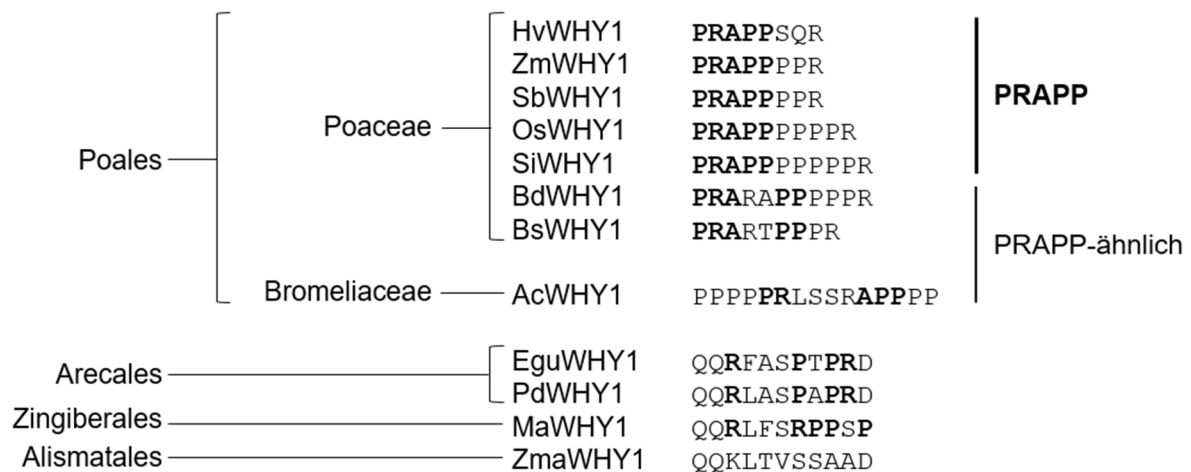


Abb. 52: Sequenzen mit PRAPP- und PRAPP-ähnlichen Motiven in den WHIRLY1-Proteinen monokotyle Pflanzen.

Das PRAPP-Motiv bzw. einzelne Prolin- und Argininreste sind fett dargestellt. Die folgenden Proteinsequenzen wurden für den Vergleich verwendet (Name, Organismus, GenBank Accessionnummer): HvWHY1, *Hordeum vulgare*, BAJ96655; ZmWHY1, *Zea mays*, NP_001123589; SbWHY1, *Sorghum bicolor*, XP_002436467; OsWHY1, *Oryza sativa*, BAD68418; SiWHY1, *Setaria italica*, XP_004964537; BdWHY1, *Brachypodium distachyon*, XP_003557198; BsWHY1, *Brachypodium sylvaticum*, ABL85062; AcWHY1, *Ananas comosus*, OAY85479.1; EguWHY1, *Elaeis guineensis*, XP_010915142.1; PdWHY1, *Phonenix dactylifera*, XP_008809721.1; MaWHY1, *Musa acuminata*, XP_009380437.1; ZmaWHY1, *Zostera marina*, KMZ68486.1.

Außer in den Poaceae sind WHIRLY1-Proteine in wenigstens fünf weiteren monokotylen Arten, *Ananas comosus* (*A. comosus*), *Zostera marina* (*Z. marina*), *Musa acuminata* (*M. acuminata*), *Phonenix dactylifera* (*P. dactylifera*) und *Elaeis guineensis* (*E. guineensis*), zu finden. *A. comosus* gehört zur Familie der Bromeliaceae. Wie die Poaceae gehören auch die Bromeliaceae zur Ordnung der Poales. Das WHIRLY1-Protein von *A. comosus* (*AcWHY1*) enthält zwar kein PRAPP-Motiv, aber eine PRAPP-ähnliche Aminosäureabfolge, die von vier Aminosäuren unterbrochen ist. Dieser Bereich erinnert an das PRAPP-ähnliche Motiv innerhalb des WHIRLY1-Proteins von *B. distachyon* (*BdWHY1*), das ebenfalls durch zwei

Aminosäuren unterbrochen vorliegt. Da die Bromeliaceae vor den Poaceae entstanden sind (Linder & Rudall 2005), könnte sich das PRAPP-Motiv während der Evolution der Poaceae aus einer solchen Sequenz entwickelt haben. Die vier weiteren genannten monokotylen WHIRLY1-Proteine gehören zu den Ordnungen der Alismatales, Arecales und Zingiberales. Sie besitzen kein PRAPP-Motiv, allerdings weisen drei der vier WHIRLY1-Proteine im N-terminalen Sequenzbereich Prolin- und Argininreste auf. Dagegen sind keine Proline oder Arginine im WHIRLY1-Protein von *Z. marina* (ZmaWHY1), welches den Alismatales angehört, zu finden. Die Ordnung der Alismatales ist die älteste der hier genannten monokotylen Ordnungen (Linder & Rudall 2005). Das deutet daraufhin, dass sich die Prolin- und Argininreste erst nach der Entstehung der Alismatales in den übrigen drei Ordnungen etabliert haben und möglicherweise Vorstufen des PRAPP-Motivs darstellen könnten. Die Entstehung der PRAPP-ähnlichen Motive hin zum PRAPP-Motiv ist jedoch auf die Poales beschränkt.

4.1.4 Histon H1-ähnliche Proteine enthalten ein PRAPP-Motiv

Da in den Datenbanken bisher keine Funktion für das PRAPP-Motiv beschrieben ist, wurde mit einer Datenbankrecherche nach weiteren Proteinen mit PRAPP-Motiven gesucht. Dabei konnten zahlreiche Proteine mit PRAPP-Motiv im Tier- und Pflanzenreich sowie in Prokaryoten identifiziert werden. Die identifizierten Proteine sind an verschiedensten zellulären Prozessen beteiligt und enthalten das PRAPP-Motiv an unterschiedlichen Positionen im Protein. Um herauszufinden, ob bekannte Verpackungsproteine über ein PRAPP-Motiv verfügen, wurde spezifisch in bakteriellen NAPs sowie in Histonen nach PRAPP-Motiven gesucht. Dabei konnte das PRAPP-Motiv in Histon H1-ähnlichen (*histone H1-like*) Proteinen von *P. dactylifera*, *Nelumbo nucifera* (*N. nucifera*) und *Gossypium raimondii* (*G. raimondii*) identifiziert werden. Histon H1-ähnliche Proteine besitzen eine H15-Domäne, die auch in den Histon H1- und H5-Proteinen zu finden ist. Die Histone H1 und H5 binden an die freie DNA vor und hinter einem Nukleosom und ermöglichen die weitere Kompaktierung der Nukleosomen in höher geordnete Chromatinstrukturen. Studien mit Histon H1-ähnlichen Proteinen von Menschen und Mäusen zeigten, dass sie ähnliche Eigenschaften bezüglich der Organisation des Chromatins besitzen wie Histon H1-Proteine (Yan et al. 2003; Tanaka et al. 2005). Das PRAPP-Motiv innerhalb der drei identifizierten Histon H1-ähnlichen Proteine liegt jedoch außerhalb oder nur zum Teil innerhalb der H15-Domäne (siehe Abb. 53), so dass offen bleibt, ob das PRAPP-Motiv in diesen Proteinen direkt an der Organisation der DNA beteiligt ist.

NnH1-like	MDSSTATVPPATAGAEVSLPPPVDSSSTVSPPPPAPPATVETSVPLPAATDSTTAPVVM	60
GrH1-like	-----MATEEPTVAV-----ESAP-EPAEENPAE-ATANPKSGKAKKAKEPK---	40
PdH1-like	-----MAAEETSAAAVEETVKDSAPAEPAGENPPA-KTAS----RTKKTKEPK---	43
	*: . . : . . * * . * : : . . . *	
NnH1-like	EPHIAHAATAPPKQASSY HP SHPPYAEMIVSAIRGLNEKKGSSKKAI AK FIDAAYT-NLP	119
GrH1-like	----AKKAAAPRK PRAP -- PA HPPYEEMVKDAIVTLKEKTGSSQYAITKFIEEKQK-NLP	93
PdH1-like	----AKKPSAPRK PRAP -- PA HPPYVEMIGEAITSLKERTGSSQYAITKFIEDKHKALP	97
	*: . : * * : . * : * * * * : * : * * * * : * : * * * : . : * *	
NnH1-like	PTHSALLSTHLKRLKKS GHVVQVKHSYKLPKAAPSAPKKGRGRPPKSKLQIVQQPVPVVI	179
GrH1-like	GNFKLLLLFHLKLV AAGKLVKVNYSYKLPSAKASKPAITASAPAKKK-----	141
PdH1-like	SNFRKLLLLFQLKLT ASGKLT IK -----PKAPVAKPK-----PK-----	132
	. . * * : * * * : * : : : * * . * : * . *	
NnH1-like	GPDGVPIQLQKRGRGRPPKPKPLSAAANGHLLIRGRGRPPKSKSKPFIVAGANGPVLAPK	239
GrH1-like	-----PAAK-SKPASKP-----KEGKRAKTTSKSPA-----KTK	170
PdH1-like	-----PAAKVTKPKAKA-----RPAKAAKTSTKDTP-----GKK	161
	. . * * . * * . *	
NnH1-like	PRGPPK PRAPP KPRRVAVPGYQPPRPRGRPRKILAVAPPVAGSVVAPIVVKQGRPRGR	299
GrH1-like	AKAAAKPKAAPKAKSTAT-----KTKAVAAVKPKATASAKPKTVAKSKAKPKEK	218
PdH1-like	SAVPAKPAASQKK-----	174
	. . . * * * *	
NnH1-like	PPKVVANVDVGGAGAVPVVSSGDLPAAGVASPAKRRGRPPKAA-----SATPTP	350
GrH1-like	PVK-----ASRTSTRTPSGKKTAAAPKAA--KKAAPKAPSKSAKPKSVKSPAK	266
PdH1-like	-----TAAPAKSAASQRKAAAKAAP--KKAKAGKTA-----AKPPAK	210
	: : . . . * * * * * . * * . * *	
NnH1-like	KRPVGRPRKVAAAQ	364
GrH1-like	KATTRRGKK-----	275
PdH1-like	KGPARKAKK-----	219
	* . . . *	

Abb. 53: Vergleich der Aminosäuresequenzen der identifizierten Histon H1-ähnlichen Proteine mit PRAPP-Motiven.

Die folgenden Proteinsequenzen wurden für den Vergleich verwendet (Name, Organismus, GenBank Accessionnummer): NnH1-like, *Nelumbo nucifera*, XP_010274698.1; GrH1-like, *Gossypium raimondii*, XP_012490662.1; PdH1-like, *Phoenix dactylifera*, XP_008778024.1. Das PRAPP-Motiv ist rot unterlegt, die Aminosäuren der H15-Domäne sind fett markiert. Symbolerklärung: * = identische Aminosäure, : = sehr ähnliche Aminosäure, . = teilweise ähnliche Aminosäure.

4.1.5 WHIRLY2-Proteine können bakterielle Nukleotide nicht kompaktieren

In dieser Arbeit wurden neben den plastidären WHIRLY-Proteinen die mitochondrialen WHIRLY2-Proteine von Gerste und Arabidopsis auf ihren Einfluss auf die Nukleoidkompaktierung in *E. coli* untersucht. Beide Proteine, die wie alle WHIRLY2-Proteine kein PRAPP-Motiv besitzen, haben erwartungsgemäß keine kompaktierende Wirkung auf die bakteriellen Nukleotide (siehe 3.2.7).

Vergleichbar mit den plastidären Nukleotiden ist die mtDNA ebenfalls in Nukleotiden organisiert (Bogenhagen 2012). Anders als in den Plastiden enthält jedes Mitochondrium nicht die gesamte mtDNA, sondern nur Teilstücke, die in Form von zirkulären, verzweigten oder linearen Subgenomen in den Mitochondrien vorliegen (Preuten et al. 2010; Gualberto &

Kühn 2014). Anders als in Tieren besteht die mtDNA von Pflanzen zu einem großen Anteil aus einzelsträngiger DNA (Backert et al. 1997). Darüber hinaus fehlen in Pflanzen die HMG-Box-Proteine (*high mobility group*, HMG), die in Tieren und Pilzen an der Verpackung doppelsträngiger mtDNA beteiligt sind (Bogenhagen 2012). Stattdessen wurden in den mitochondrialen Nukleoiden der Pflanzen zahlreiche Proteine identifiziert, die einzelsträngige DNA binden (Gualberto & Kühn 2014), zu denen auch AtWHIRLY2 gehört (Maréchal et al. 2008). Für AtWHIRLY2 wird eine Rolle bei der Replikation und Transkription der mtDNA diskutiert, die von der Interaktion des Nukleinsäure-Bindemotivs (KGKAAL) des AtWHIRLY2-Proteins mit einzelsträngiger DNA abhängig zu sein scheint (Gualberto & Kühn 2014; Cai et al. 2015). Die Replikation in den Mitochondrien und in den Plastiden würde demnach auf unterschiedliche Weise reguliert werden. Während die Replikation in den Plastiden von DNA-Doppelstrang-Bindeproteinen wie HvWHIRLY1 gesteuert wird, könnte die Regulation der Replikation in den Mitochondrien über DNA-Einzelstrang-Bindeproteine erfolgen. Die Kompaktierungsaktivität von DNA-Einzelstrang-Bindeproteinen kann jedoch in *E. coli* nicht getestet werden.

4.1.6 Bedeutung der Dimerisierung von HvWHIRLY1 für die Kompaktierung der Nukleoide

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass das HvWHIRLY1-Protein über das PRAPP-Motiv bakterielle Nukleoide kompaktieren kann. Es stellt sich die Frage, ob HvWHIRLY1 in Form eines Monomers oder eines Oligomers als Kompaktierungsprotein aktiv ist. Für die WHIRLY-Proteine von Arabidopsis wurde gezeigt, dass sie neben dem Monomer außerdem als Tetra- und 24-mer vorliegen (Desveaux et al. 2002; Cappadocia et al. 2010; 2012). Sowohl das Tetramer als auch das 24-mer ist in der Lage, an einzelsträngige DNA zu binden (Desveaux et al. 2000; Cappadocia et al. 2012). Mittels Rasterkraftmikroskopie wurde gezeigt, dass sich das 24-mer in Abhängigkeit von dem zweiten Lysin innerhalb des Nukleinsäure-Bindemotivs (KGKAAL) bildet (Cappadocia et al. 2012). Die heterologen Expressionsstudien ergaben hingegen, dass der Austausch des besagten Lysins nicht zur Aufhebung der Kompaktierungsaktivität von HvWHIRLY1 in *E. coli* führte (siehe 3.2.2). Damit kann eine Beteiligung des 24-mers an der Verpackung der Nukleoide in der Gerste ausgeschlossen werden. Darüber hinaus ergaben Studien am WHIRLY1-Protein der Kartoffel, dass die Bindung des Tetramers an einzelsträngige DNA durch das Nukleinsäure-Bindemotiv erfolgt (Desveaux et al. 2002). Die Ausbildung des Tetramers ist zudem in *E. coli* möglich, wie für das rekombinante WHIRLY1-Protein des Mais gezeigt werden konnte (Prikryl et al. 2008). Das ZmWHIRLY1-Protein bewirkt wie HvWHIRLY1 eine Kompaktierung der Nukleoide in *E. coli* (siehe 3.2.4). In *E. coli* hatte die Deletion des Nukleinsäure-Bindemotivs im

HvWHIRLY1-Protein jedoch keinen Einfluss auf die Nukleoidverpackung (siehe 3.2.2), so dass die Kompaktierung durch Interaktion des Tetramers mit einzelsträngiger DNA unwahrscheinlich ist. Ob das Tetramer bei der Verpackung der Nukleole dennoch eine Rolle spielt, bleibt unklar.

Nach der Aufreinigung des rekombinanten HvWHIRLY1-Proteins aus *E. coli* waren mit dem α -HvWHIRLY1-Antikörper mehrere Banden mit unterschiedlichen Molekulargewichten detektierbar (siehe Anhang, Abb. 69). Neben dem Monomer, das bei 27 kDa nachweisbar war, war zudem eine weitere prominente Proteinbanden bei 55 kDa, welche ein Dimer repräsentieren könnte, und zwei schwächere Signale bei 97 kDa sichtbar, welche das Tetramer darstellen könnten. In den Nukleoidfraktionen der Gerste waren allerdings nur das Monomer und das Dimer nachzuweisen, jedoch nicht das Tetramer (siehe 3.3.3). Da auch in Bakterien zahlreiche NAPs, die an der strukturellen Organisation der Nukleole beteiligt sind, unter anderem HU, IHF, H-NS und Fis, als Dimer vorliegen (Dillon & Dorman 2010), ist denkbar, dass HvWHIRLY1 als Dimer die Funktion eines Kompaktierungsproteins übernehmen kann. Trotz der denaturierenden und reduzierenden Bedingungen der SDS-PAGE konnte das potentielle Dimer nicht aufgebrochen werden (siehe 3.3.3), so dass die beiden Monomere höchstwahrscheinlich durch eine kovalente Bindung miteinander verbunden sind. Die Verknüpfung von Proteinen durch kovalente Bindungen kann durch Disulfidbrücken oder durch *protein cross linking* unter Ausbildung einer Isopeptidbindung durch Transglutaminasen erfolgen. Eine Disulfidbrückenbindung zur Stabilisierung des Dimers kann aus zwei Gründen ausgeschlossen werden. Zum einen werden Disulfidbrückenbindungen durch Reduktionsmittel wie DTT (Dithiothreitol), welches bei der denaturierenden SDS-PAGE zur Anwendung kam, aufgebrochen. Eine Inkubation mit erhöhten DTT-Mengen führte aber nicht zum Aufbrechen der Bindung. Zum anderen spricht die Anwesenheit des Dimers in den *E. coli*-Zellen gegen eine Disulfidbrücke, da diese nur im Periplasma gram-negativer Bakterien ausgebildet werden können (Hatahet et al. 2014). Das rekombinante HvWHIRLY1-Protein wurde aber im Cytoplasma synthetisiert, wo keine Disulfidbrückenbindungen ausgebildet werden können. Im Unterschied dazu ist die Ausbildung eines Dimers durch Transglutaminasen, die eine kovalente Bindung zwischen einem Glutamin- und einem Lysinrest ermöglichen, nicht durch denaturierende und reduzierende Bedingungen aufzuheben (Ragkousi & Setlow 2004). Bei Transglutaminasen handelt es sich um eine Familie von Enzymen, die in Abhängigkeit von Ca^{2+} -Ionen an der posttranslationalen Modifikation von Proteinen beteiligt sind (Lorand & Graham 2003). Transglutaminasen sind in vielen Organismen verbreitet. Sie konnten in Pflanzen, Tieren, Bakterien und Pilzen identifiziert werden (Folk 1980; Lorand & Graham 2003; Del Duca & Serafini-Fracassini 2005). Außerdem sind sie in Chloroplasten zu finden (Sobieszczyk-Nowicka & Legocka 2014). In Chloroplasten sind Transglutaminasen sowohl im Stroma als auch an der Thylakoidmembran lokalisiert, wo sie die große Untereinheit der

Rubisco bzw. die LHCII-Proteine als Substrat haben (Dondini et al. 2003). Eine Besonderheit der plastidär lokalisierten Transglutaminasen ist ihre lichtgesteuerte Aktivierung (Del Duca et al. 1995; Dondini et al. 2003). Transglutaminasen ermöglichen die Ausbildung von kovalenten Bindungen zwischen einem Lysin- und einem Glutaminrest innerhalb eines Proteins oder zwischen zwei Proteinen (Serafini-Fracassini & Del Duca 2008; Sobieszczuk-Nowicka & Legocka 2014). Dabei können Transglutaminasen einerseits den Lysin- und Glutaminrest durch *protein cross linking* unter Ausbildung einer Isopeptidbindung direkt kovalent miteinander verknüpfen (ϵ -(γ -glutamyl) lysine). Andererseits kann das *cross linking* zweier Proteine über ein Polyamin (*N, N - bis (γ -glutamyl) amine*), welches als Verbindung zwischen dem Glutamin- und Lysinrest fungiert, erfolgen. Dabei werden der Glutamin- und der Lysinrest jeweils über eine Isopeptidbindung mit dem Polyamin verbunden. Polyamine sind primäre, polykationische Amine mit kleinem Molekulargewicht. Sie sind in Pflanzen, Tieren und Bakterien zu finden und kommen in Pflanzen in Form von Putrescin, Spermidin und Spermin vor (Bais & Ravishankar 2002; Liu et al. 2015; Michael 2016). Wie Transglutaminasen wurden sie in den Plastiden identifiziert (Sobieszczuk-Nowicka & Legocka 2014). Es konnte gezeigt werden, dass Polyamine mit der DNA interagieren und die Struktur der DNA regulieren können (Pavan et al. 2009; Pasini et al. 2014). Untersuchungen mit HU und IHF ergaben, dass die beiden bakteriellen NAPs im Zusammenspiel mit Polyaminen eine veränderte Nukleoidstruktur bewirken (Sarkar et al. 2007; 2009). Während Polyamine allein eine ringförmige Organisation der DNA fördern, bewirken sie in Anwesenheit von IHF eine stäbchenförmige Organisation der DNA (Sarkar et al. 2009).

Durch das zuvor beschriebene *cross linking* wird die Konformation und die Stabilität der Proteine verändert (Serafini-Fracassini & Del Duca 2008). Ein *cross linking* zweier HvWHIRLY1-Monomere wäre direkt oder über Polyamine denkbar (Sobieszczuk-Nowicka & Legocka 2014). Dabei könnten Polyamine auf Grund ihrer positiven Ladung und ihrer Neigung an DNA zu binden, die Kompaktierungsaktivität von HvWHIRLY1 begünstigen. Das reife HvWHIRLY1-Protein enthält zehn Glutamin- und elf Lysinreste, die potentielle Angriffstellen für Transglutaminasen darstellen könnten (Abb. 54). Da das rekombinante HvWHIRLY1-Protein auch in *E. coli* als Kompaktierungsprotein aktiv ist und die dimerisierte Form nachweisbar ist (siehe 3.2.1 und Anhang, Abb. 69), müsste das *cross linking* in *E. coli* ähnlich wie in der Gerste ablaufen. Da Transglutaminasen und Polyamine sowohl in den Chloroplasten als auch in den Bakterien zu finden sind, ist das grundsätzlich möglich (Lorand & Graham 2003; Serafini-Fracassini & Del Duca 2008; Sobieszczuk-Nowicka & Legocka 2014; Michael 2016).

MPPPLSVSLPSPQSPSLLPRHARLPLAPAQPLSARAPPSSVCSVVPARHSADYFDPRAPP	60
SQRDAYGQPPSPLEREPPVPGGQAGRVFASYSIYKGAALAFDPRPPQFVPLESGAYKVA	120
KEGFVLLQFAPAVGPRQYDWARQVFSLSVWEMGTLTLLGLTDSCEFFHDPFKGRSDEGK	180
VRKVLKVEPTPDGNGRFFNLSVQNRLNVDENIYIPITKGEYAVIVSTFNYIIPHIMGWS	240
TFTNSIKPEESQPYNRPQSSPELEWRR	267

Abb. 54: Glutamin- und Lysinreste in der Aminosäuresequenz des HvWHIRLY1-Proteins.

Die Lysinreste (K) sind in orange, die Glutaminreste (Q) sind in rot hervorgehoben. Die plastidäre Transitsequenz wurde mit dem Programm TargetP ermittelt und ist grün unterlegt. Die Aminosäuren der WHIRLY-Domäne sind fett markiert.

4.2 Entwicklungsabhängige Kompaktierung der Nukleoide durch HvWHIRLY1

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass das HvWHIRLY1-Protein während der Chloroplastendifferenzierung für die entwicklungsabhängigen morphologischen Veränderungen der Nukleoide im Wildtyp verantwortlich ist. Im Wildtyp werden die Nukleoide während der Chloroplastenentwicklung von der inneren Hüllmembran zu den Thylakoidmembranen umverteilt, weshalb sie in den ausdifferenzierten Chloroplasten der Blattspitze als kleine punktförmige Strukturen an der Thylakoidmembran zu finden sind (siehe 3.1.2) (Miyamura et al. 1986; Sato et al. 1993; Sakai et al. 2004). Im Unterschied dazu führt eine Reduktion der HvWHIRLY1-Proteinmenge in den beiden WHIRLY1-RNAi-Linien dazu, dass in jungen Chloroplasten des mittleren Blattsegmentes mehr einzelne Nukleoide, die deutlich größer sind als im Wildtyp, in der Peripherie zu erkennen sind. In der Blattspitze ist der Unterschied zwischen den Nukleoiden des Wildtyps und denen der RNAi-Linien am deutlichsten. Die in den RNAi-Linien vergrößerten Nukleoide sind eher in der Peripherie als an den Thylakoidmembranen lokalisiert (siehe 3.1.2) und weisen einen geringeren Kompaktierungsgrad auf (Krupinska et al. 2014a). Darüber hinaus sind auch einige der kleinen für den Wildtyp typischen Nukleoide, welche im Inneren der Plastiden zu finden sind, in den RNAi-Linien zu beobachten. Das WHIRLY1-Protein der Gerste ist somit nicht an der Kompaktierung aller Nukleoide während der Chloroplastendifferenzierung beteiligt, sondern nur an der Kompaktierung einer Teilpopulation. Entsprechend wurde in einer Kollokalisationsstudie mit dem Protein PEND eine Kollokalisation des HvWHIRLY1-Proteins mit nur einigen Nukleoiden gezeigt (Melonek et al. 2010). Während in den jungen und ausdifferenzierten Chloroplasten der RNAi-Linien vergrößerte Nukleoide erkennbar sind, sind in der Blattbasis keine Unterschiede in der Morphologie zwischen den Nukleoiden des Wildtyps und denen der RNAi-Linien zu beobachten (siehe 3.3.2). Das HvWHIRLY1-Protein ist somit vor allem in

den Chloroplasten als Kompaktierungsprotein aktiv und scheint auch an der Umverteilung der Nukleotide während der Chloroplastendifferenzierung an die Thylakoide beteiligt zu sein. Die Reduktion des Kompaktierungsgrades der Nukleotide ist zudem von der noch in den beiden WHIRLY1-RNAi-Linien enthaltenen HvWHIRLY1-Proteinmenge abhängig. Im Vergleich zum Wildtyp enthält W1-1 nur etwas mehr HvWHIRLY1-Protein als W1-7 (Kapitel 3.1.2, Tab. 11). Doch dieser kleine Unterschied führt bereits zu einem deutlich geringeren Kompaktierungsgrad der Nukleotide in W1-7 im Vergleich zu W1-1 (siehe 3.1.2). Demnach können geringfügige Unterschiede in der Menge des HvWHIRLY1-Proteins sichtbare Veränderungen in der Nukleotidstruktur zur Folge haben. Zudem sind geringe Mengen an HvWHIRLY1 in den Nukleotiden offensichtlich ausreichend, um die Kompaktierung der Nukleotide zu ermöglichen.

Immunologische Untersuchungen mit Gesamtproteinextrakten (siehe 3.1.1) und Plastiden (Grabowski et al. 2008) zeigten, dass das HvWHIRLY1-Protein nicht nur in der Blattmitte und -spitze akkumuliert, sondern bereits im basalen Blattsegment nachweisbar ist. Es stellt sich deshalb die Frage, warum HvWHIRLY1 erst im mittleren Blattsegment die Kompaktierung der Nukleotide verändert und nicht schon während der frühen Entwicklung. Eine mögliche Erklärung könnte eine entwicklungsabhängig gesteuerte Dimerisierung der HvWHIRLY1-Monomere sein. Wäre HvWHIRLY1 bereits während der frühen Plastidenentwicklung im basalen Blattsegment im gleichen Maß wie in den ausdifferenzierten Chloroplasten als Kompaktierungsprotein aktiv, würde die dort ablaufende Replikation der ptDNA (Baumgartner et al. 1989) durch die kompakte Nukleotidstruktur verhindert werden. Die Dimerisierung des Proteins ist demnach wahrscheinlich in Abhängigkeit von der Entwicklung reguliert. Dies könnte durch lichtabhängige Transglutaminasen nach dem Aufbau des Photosyntheseapparates, der über die Elektronentransportkette Licht wahrnimmt (Foyer et al. 2014), in jungen Chloroplasten gesteuert sein. HvWHIRLY1 würde demnach erst nach erfolgter Replikation im mittleren Blattsegment der Gerste als Dimer vorliegen und in dieser Form die Struktur der Nukleotide verändern können. Unklar bleibt jedoch, ob HvWHIRLY1 in den basalen Blattsegmenten in den Nukleotiden lokalisiert ist, in welcher Form es dort vorkommt und welche Funktion es erfüllt.

Für die zwei Proteine SIR und SWIB-4, welche neben HvWHIRLY1 in Höheren Pflanzen als Kompaktierungsproteine der Nukleotide identifiziert werden konnten (Cannon et al. 1999; Sekine et al. 2007; Kang et al. 2010; Melonek et al. 2012), wurde bislang nicht untersucht, ob deren Funktion wie bei HvWHIRLY1 entwicklungsabhängig reguliert ist. Alle Untersuchungen mit SIR von *G. max*, *P. sativum* und *N. benthamiana* und SWIB-4 von *Arabidopsis* bezüglich ihrer subzellulären Lokalisation oder ihrer Funktion als Kompaktierungsprotein wurden ausschließlich mit ausdifferenziertem Gewebe oder *in vitro* mit isolierter DNA aus Chloroplasten

durchgeführt (Cannon et al. 1999; Sekine et al. 2007; Kang et al. 2010; Melonek et al. 2012). Im Fall von SWIB-4 wurde die Kompaktierungsaktivität bislang nur in *E. coli* gezeigt (Melonek et al. 2012). Es ist aber gut möglich, dass die Verpackung der Nukleioide zu verschiedenen Entwicklungsstadien durch unterschiedliche Proteine erfolgt, um die Konformation und strukturelle Organisation der ptDNA an die gerade benötigten Anforderungen der Plastiden anzupassen. Für Bakterien ist bereits bekannt, dass sich sowohl die Nukleoidstruktur als auch die Proteinzusammensetzung der Nukleioide in Abhängigkeit von der Wachstumsphase und von äußeren Faktoren ändert. Von den bakteriellen NAPs akkumuliert Fis vermehrt in der frühen exponentiellen Phase, Dps in der stationären Phase, während H-NS in fast allen Wachstumsphasen nachweisbar ist (Dillon & Dorman 2010; Rimsky & Travers 2011). In Pflanzen gibt es ebenfalls Hinweise darauf, dass sich die Zusammensetzung der ptNAPs in den Nukleoiden entwicklungsabhängig ändert. Erste Befunde über Veränderungen in der Proteinzusammensetzung der Nukleioide während der Chloroplastenentwicklung von Proplastiden zu Chloroplasten wurden in Studien an *P. sativum* und *N. tabacum* dokumentiert (Nemoto et al. 1991; Sato et al. 1993; 1997). So konnte beispielsweise eine Assoziation der Nukleioide durch PEND an die innere Hüllmembran ausschließlich in jungen, aber nicht in ausdifferenzierten Chloroplasten gezeigt werden (Sato et al. 1993). Neuere Proteomanalysen deuten ebenfalls darauf hin, dass sich die Proteinzusammensetzung der Nukleioide während der Entwicklung der Plastiden ändert (Majeran et al. 2012; Melonek et al. 2016).

Wie bereits beschrieben, kommt es während der Entwicklung außerdem zu Veränderungen in der Verteilung der Nukleioide innerhalb der Plastiden, wodurch nukleoidspezifische Prozesse reguliert werden. Die Bindung der Nukleioide an die innere Hüllmembran scheint für die Replikation der ptDNA wichtig zu sein, wohingegen die Bindung an die Thylakoidmembran eine regulierte Genexpression ermöglicht (Sato et al. 2003; Sakai et al. 2004). Durch die enge Assoziation der Nukleioide mit der Thylakoidmembran kann die Genexpression durch den Reduktions-Oxidations-Status (Redox-Status), der sich in Abhängigkeit von Umweltbedingungen ändert, reguliert werden (Dietz & Pfannschmidt 2011; Allen 2015). Die Variabilität der Nukleioide hinsichtlich Proteinzusammensetzung und Verteilung sowie die damit einhergehende strukturelle Organisation der Nukleioide scheinen in einem engen Zusammenhang mit entwicklungsabhängigen und nukleoidspezifischen Prozessen zu stehen. Das HvWHIRLY1-Protein, welches die Nukleoidstruktur in jungen sowie ausdifferenzierten Chloroplasten kompaktiert, könnte am Funktionswechsel der Nukleioide von der Replikation in jungen Chloroplasten zur Transkription in reifen Chloroplasten beteiligt sein. Baumgartner et al. (1989) konnten zeigen, dass der ptDNA-Gehalt in der Gerste entwicklungsabhängigen Schwankungen unterliegt. Die Replikation läuft von den Pro-

plastiden bis in die jungen Chloroplasten ab, was einen Anstieg der ptDNA von dem basalen Blattsegment bis ins hier untersuchte mittlere Blattsegment des Primärblattes zur Folge hat. Im Laufe der Ausdifferenzierung nimmt die ptDNA der Chloroplasten im Licht jedoch wieder ab. Entwicklungsabhängige Veränderungen in der ptDNA-Menge waren auch hier in den Segmenten der Primärblätter des Wildtyps messbar (siehe 3.1.2). Im Vergleich zum Wildtyp war ein erhöhter ptDNA-Gehalt in der Linie W1-7 nur im Spitzensegment, aber nicht im basalen und im mittleren Blattsegment nachweisbar. Demnach findet in W1-7 eine vermehrte Replikation während der Ausdifferenzierung der Chloroplasten von der Blattmitte zur -spitze statt. Das ist der Blattbereich, in dem im Wildtyp keine Replikation mehr erfolgt. Eine Erklärung für die erhöhte Replikation könnte daher der durch die reduzierte Menge des HvWHIRLY1-Proteins veränderte Verpackungsgrad der Nukleioide in den jungen Chloroplasten sein, der mit der Assoziation der Nukleioide in der Peripherie einhergeht (siehe 3.1.2). Ein Zusammenhang zwischen der Nukleoidverpackung und der Replikation wurde auch für SIR gezeigt. So führt SIR zu einer verstärkten Kompaktierung der Nukleioide, wodurch die Replikation der ptDNA *in vitro* gehemmt wird (Cannon et al. 1999). Zudem bewirkte die Überproduktion von SIR in *E. coli* eine stärkere Verpackung bakterieller Nukleioide (Kang et al. 2010), wie ebenfalls für HvWHIRLY1 in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde (siehe 3.2.1). Für den Zusammenhang von ptDNA-Gehalt und Kompaktierungsgrad der Nukleioide spricht auch, dass Primärblätter der Linie W1-7, in der die Nukleioide entpackter vorliegen, eine größere Erhöhung der ptDNA-Menge als Primärblätter der Linie W1-1 aufweisen (siehe 3.1.2).

Der geringere Kompaktierungsgrad der Nukleioide der Linie W1-7 könnte nicht nur die Replikationsaktivität in den Plastiden beeinflussen, sondern auch die Transkription plastidärer Gene. *Run-on*-Transkriptionsanalysen mit Chloroplasten des Wildtyps und der Linie W1-7 ergaben eine reduzierte plastidäre Transkriptionsaktivität für W1-7 im Vergleich zum Wildtyp (unveröffentlichte Daten, S. Braun). Die Transkriptspezifität ist in W1-7 hingegen nicht verändert, was darauf hindeutet, dass die Kompaktierung der ptDNA durch HvWHIRLY1 unabhängig von der Sequenz erfolgt und HvWHIRLY1 alle Bereiche der ptDNA in gleicher Weise binden und kompaktieren kann. Diese Befunde unterstützen die DIP-CHIP-Analysen, bei denen ZmWHIRLY1 mit der gesamten ptDNA koimmunpräzipitiert wurde (Prikryl et al. 2008).

Zur Klärung der Frage, ob die erhöhte Replikationsaktivität der Linie W1-7 ausschließlich auf eine erhöhte Zugänglichkeit der ptDNA zurückgeführt werden kann oder auch auf eine erhöhte Menge an organellärer DNA Polymerase, wurde die Transkriptmenge von *HvPolII-like* im Wildtyp und der Linie W1-7 analysiert (siehe 3.1.2). Die größte Transkriptmenge ist im basalen Blattsegment des Wildtyps nachweisbar, während die Transkriptmenge in jungen

und ausdifferenzierten Mesophyllzellen stark reduziert ist. Auch in *O. sativa* ist die Menge des Transkripts von *OsPoli-like* in meristematischen Geweben am höchsten, während in ausdifferenzierten Blättern keine Expression nachweisbar ist (Kimura et al. 2002). Im Unterschied zum Wildtyp ist in W1-7 eine um mindestens 80 % erhöhte Expression von *HvPoli-like* in allen Entwicklungsstadien des Gerstenprimärblattes zu messen. Die größte Erhöhung ist in jungen Chloroplasten des mittleren Blattsegmentes im Vergleich zum mittleren Blattsegment des Wildtyps nachweisbar. Das heißt, dass die Expression des *HvPoli-like*-Gens in der Linie W1-7 nicht wie im Wildtyp herunterreguliert wird und dass HvWHIRLY1 ein negativer Regulator des *HvPoli-like*-Gens ist. Auch andere Kerngene der Gerste sowie von Arabidopsis scheinen durch WHIRLY1 reguliert zu werden (Isemer 2013, unveröffentlichte Daten K. Krupinska), so dass WHIRLY1-Proteine eine Rolle bei der retrograden Signalübertragung an den Zellkern spielen könnten. Die Übertragung von retrograden Signalen ist wichtig, um die Genexpression des Zellkerns und der Plastiden z. B. während der Entwicklung und bei Stress aufeinander abzustimmen (Woodson & Chory 2008; Chan et al. 2016).

4.3 Auswirkungen unterschiedlicher Lichtintensitäten auf die Menge an HvWHIRLY1 und die plastidären Nukleoide

4.3.1 HvWHIRLY1 wird zur Anpassung an hohe Lichtintensitäten benötigt

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Menge des HvWHIRLY1-Proteins, trotz erheblicher Unterschiede in der Akkumulation, sowohl im Wildtyp als auch in den beiden WHIRLY1-RNAi-Linien 1 und 7 entwicklungsabhängigen Schwankungen unterliegt (siehe 3.3.1). Die HvWHIRLY1-Proteinmenge wird vermutlich durch posttranskriptionale Prozesse reguliert und ist nicht allein von den *HvWHIRLY1*-Transkripten abhängig, deren Menge während der Entwicklung nicht mit der Akkumulation des Proteins einhergeht (siehe 3.1.1) (Grabowski 2008). Neben der entwicklungsabhängigen Akkumulation unterliegt das HvWHIRLY1-Protein im Wildtyp und in den RNAi-Linien zudem einer lichtgesteuerten Regulation. So bewirken hohe Lichtintensitäten sowohl in Gesamtproteinextrakten der drei Blattsegmente als auch in Chloroplasten und Nukleoidfraktionen eine Abnahme von HvWHIRLY1 (siehe 3.3.1 und 3.3.3). Im Unterschied zur Blattbasis, in der keine lichtabhängigen Veränderungen der Nukleoide beobachtet werden können, führt die Abnahme von HvWHIRLY1 infolge der hohen Lichtintensität in der Blattspitze, trotz unverändertem ptDNA-Gehalt, zu diffusen YO-PRO®-1-Signalen und schwächer gefärbten Nukleoiden im Wildtyp und der Linie W1-1 (siehe 3.3.2). Diese schwächere Färbung deutet auf einen reduzierten Kompaktierungsgrad

der plastidären Nukleoide hin (Cannon et al. 1999). Die Entpackung der Nukleoide könnte die Folge einer lichtstressabhängigen Monomerisierung von HvWHIRLY1 sein, was HvWHIRLY1 für den proteolytischen Abbau leichter zugänglich machen könnte. Die Abnahme des HvWHIRLY1-Monomers und des potentiellen HvWHIRLY1-Dimers in Nukleoidfraktionen im Hochlicht (siehe 3.3.3) unterstützt diese Annahme. Der Abbau könnte durch plastidäre Proteasen, wie z. B. die Clp-Protease erfolgen (Olinares et al. 2010). ClpC1, ein Chaperon der Clp-Protease (Sjögren et al. 2014), wurde als möglicher Interaktionspartner des AtWHIRLY3-Proteins identifiziert (Isemer 2013). Die Monomerisierung des HvWHIRLY1-Dimers könnte z. B. durch Transglutaminasen, welche sowohl die Ausbildung als auch die Spaltung der Isopeptidbindung durchführen (Lorand & Graham 2003), erfolgen. Im Hinblick auf ihre lichtgesteuerte Aktivierung in den Chloroplasten, wäre eine Funktion bei Hochlicht möglich (Del Duca et al. 1995; Dondini et al. 2003). Inwiefern die Transglutaminasen durch Hochlicht in ihrer Funktion verändert werden und welche anderen Faktoren für eine Monomerisierung der HvWHIRLY1-Dimere eine Rolle spielen, bleibt jedoch offen.

Da Licht wichtig für die Chloroplastenentwicklung und die Photosynthese ist, sind neben den klassischen Lichtrezeptoren, Phytochrom und Cryptochrom (Han et al. 2007; Larkin & Ruckle 2008), auch zahlreiche plastidäre Signale bei der Anpassung an Licht beteiligt (Dietz 2015). Neben photochemischen Signalen von Komponenten der Photosynthese, wie die Redoxänderungen am Plastochinon-Pool oder die Bildung des Singulett-Sauerstoffs, kommt es zu Konzentrationsänderungen von Metaboliten sowie von Phytohormonen wie Abscisinsäure oder Salicylsäure und zur Anpassung der Translation und Transkription. Im Vergleich zu den Primärblättern des Wildtyps zeigen die Linien W1-1 und W1-7 eine Aufhellung der Blattspalte unter hoher Lichtintensität. Eine dauerhafte Anzucht der RNAi-Linien im Hochlicht führt zu einer stärkeren Aufhellung als der Transfer der Pflanzen für einen Tag ins Hochlicht. Die geringere HvWHIRLY1-Proteinmenge bewirkt folglich eine erhöhte Anfälligkeit der RNAi-Linien gegenüber photooxidativem Stress bei hohen Lichtintensitäten. Unter photooxidativem Stress versteht man die vermehrte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) durch die Absorption von überschüssiger Lichtenergie während der Photosynthese (Foyer et al. 1994). Übersteigt die Akkumulation von ROS die detoxifizierenden Antioxidationsysteme der Plastiden, führt ihre erhöhte Konzentration zur unspezifischen Oxidation und Schädigung von Proteinen, Lipiden, Pigmenten und Nukleinsäuren (Scandalios 1993; Hideg et al. 2002; Pintó-Marijuan & Munné-Bosch 2014). Die photooxidative Schädigung von Komponenten der Photosynthese resultiert in einem Bleichen der Pigmente dem sogenannten *photobleaching* (Olszówka et al. 2003), wie es hier für W1-7 und abgeschwächt für W1-1 zu erkennen ist (siehe 3.3.1). Damit könnte HvWHIRLY1 in den Plastiden an der Anpassung an veränderte Lichtbedingungen und möglicherweise anderen Umweltbedingungen beteiligt sein. Hohe

Lichtintensitäten führen zu Störungen in den Plastiden, die experimentell auch durch die Behandlung der Pflanzen mit Norflurazon ausgelöst werden können. Diese Störungen führen normalerweise zu einer Herunterregulation der Expression kernkodierter Photosyntheseproteine (*photosynthesis-associated nuclear genes*, PhANGs) wie z. B. RBCS oder LHCB (Oelmüller & Mohr 1986; Nott et al. 2006). Die hohen Lichtintensitäten werden in den WHIRLY1-RNAi-Linien der Gerste wahrgenommen, da es zu einer stärkeren Produktion von ROS im Vergleich zum Wildtyp kommt (unveröffentlichte Daten, A. Krieger-Liszkay). Die unverändert hohe Expression der PhANGs in WHIRLY1-defizienten Pflanzen sowohl bei hoher Lichtintensität (unveröffentlichte Daten, K. Krupinska) als auch nach Behandlung mit Norflurazon (Isemer 2013) deuten darauf hin, dass WHIRLY1 an der retrograden Signalübertragung beteiligt ist. Das Protein GUN1 (*genomes uncoupled 1*) hat ebenfalls eine Funktion bei der Wahrnehmung und Weiterleitung von plastidären Signalen, die der retrograden Signalübertragung an den Zellkern dienen (Koussevitzky et al. 2007). Das Fehlen von GUN1 führt wie im Fall von HvWHIRLY1 zu einem *photobleaching* der Blätter bei hohen Lichtintensitäten (Ruckle et al. 2007). Daher scheinen sowohl HvWHIRLY1 als auch GUN1 für die Anpassung von Pflanzen an hohe Lichtintensitäten wichtig zu sein.

Im Fall von HvWHIRLY1 wäre denkbar, dass es nach einer stressinduzierten Monomerisierung als retrogrades Signal an den Zellkern übertragen werden könnte, um z. B. die Genexpression zu verändern. Von Foyer und Koautoren (2014) wurde diskutiert, dass HvWHIRLY1-Oligomere in Folge bestimmter Umweltbedingungen in den Chloroplasten monomerisiert werden und dass das Monomer zur Übermittlung retrograder Signale an den Zellkern dienen könnte. Demzufolge könnte HvWHIRLY1 in den Plastiden eine ähnliche Funktion wie NPR1 (*nonexpressor of pathogenesis-related genes 1*) im Cytoplasma haben (Foyer et al. 2014). Nach der Monomerisierung von NPR1, die durch das Aufbrechen von Disulfidbrückenbindungen infolge von Salicylsäure-abhängigen Redoxänderungen erfolgt (Mou et al. 2003), wird NPR1 aus dem Cytoplasma in den Zellkern umverteilt, wo es die Expression von Pathogenabwehrgenen induziert (Després et al. 2003; Rochon et al. 2006). Salicylsäure hat eine wichtige Funktion bei der Aktivierung von Abwehrmechanismen gegen Pathogene zur Ausbildung der systemisch erworbenen Resistenz (Gaffney et al. 1993). Ebenso ist auch das AtWHIRLY1-Protein an der Pathogenabwehr beteiligt, da es als Transkriptionsfaktor für *PR*-Gene fungiert (Desveaux et al. 2004). Außerdem wurde gezeigt, dass die DNA-Bindeaktivität von AtWHIRLY1 durch Salicylsäure erhöht wird und dass AtWHIRLY1 die Salicylsäure-abhängige Genexpression bei der Pathogenabwehr im Zellkern reguliert (Desveaux et al. 2004). Erhöhte Mengen an Salicylsäure, die bei Stress zum Großteil in den Chloroplasten synthetisiert werden (Dempsey et al. 2011), sind auch wichtig für die Anpassung an hohe Lichtintensitäten (Mateo et al. 2006). Aus diesen Gründen könnte ein Zusammenspiel von Salicylsäure und WHIRLY1-Proteinen nicht nur bei der

Pathogenabwehr, sondern auch bei der Anpassung an hohe Lichtintensitäten wichtig sein. Die erhöhte Konzentration der Salicylsäure infolge von Hochlicht könnte im Zellkern die Bindung des HvWHIRLY1-Proteins an die Promotoren von Genen, die eine Rolle bei der Anpassung an Licht spielen, begünstigen.

Anders als im Wildtyp und in der Linie W1-1 sind in der Linie W1-7, die nur Spuren von HvWHIRLY1 enthält, keine morphologischen Veränderungen der Nukleole durch Hochlicht zu erkennen. Dennoch könnten die hohen Lichtintensitäten durch die weitere Abnahme von HvWHIRLY1 zu geringfügigen Veränderungen der Nukleolestruktur in W1-7 führen, die mikroskopisch nicht nachweisbar sind. In Kapitel 4.2 wurde die Hypothese aufgestellt, dass HvWHIRLY1 an der retrograden Signalübertragung zur Hemmung der *HvPolI-like*-Genexpression beteiligt sein könnte. Diese Annahme muss auf Grund der Experimente unter hohen Lichtintensitäten verworfen werden. Wie bereits weiter oben im Kapitel erwähnt wurde, ist die Übertragung retrograder Signale zur Anpassung der Expression der PhANGs in den WHIRLY1-RNAi-Linien bei hohen Lichtintensitäten gestört. Hätte HvWHIRLY1 direkt einen Einfluss auf die Repression des *HvPolI-like*-Gens, müsste sich die ptDNA-Menge nicht nur in der Linie W1-7, sondern auch in der Linie W1-1 infolge von hohen Lichtintensitäten ändern. Dies ist jedoch nicht der Fall. Nur W1-7 weist einen erhöhten ptDNA-Gehalt sowohl im basalen als auch im apikalen Blattsegment nach Anzucht bei hohen Lichtintensitäten auf (siehe 3.3.2), weshalb unwahrscheinlich ist, dass HvWHIRLY1 direkt an der Repression des *HvPolI-like*-Gens beteiligt ist. Die Replikation der ptDNA wird vermutlich nur über den Kompaktierungsgrad der Nukleole, der die Zugänglichkeit der ptDNA für die Replikationsmaschinerie steuert, reguliert. Im Wildtyp und der Linie W1-1 ist trotz der Reduktion der HvWHIRLY1-Proteinmenge unter hoher Lichtintensität ausreichend HvWHIRLY1 zur Kompaktierung der ptDNA und damit zur Hemmung der Replikation vorhanden. Erst in der Linie W1-7, in der bei hohen Lichtintensitäten nur noch Spuren von HvWHIRLY1 nachweisbar sind, ist zu wenig HvWHIRLY1-Protein enthalten, um eine ausreichende Verpackung der Nukleole aufrechtzuerhalten, was zur erhöhten Zugänglichkeit der ptDNA für die Replikationsmaschinerie führt. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die Expression des *HvPolI-like*-Gens unter der retrograden Kontrolle von anderen Signalproteinen, wie GUN1 oder PRIN2 (*plastid redox insensitive 2*) steht. GUN1 und PRIN2 sind in den Plastiden an der Signalübertragung plastidärer Informationen beteiligt und zudem in den Nukleolen lokalisiert (Koussevitzky et al. 2007; Kindgren et al. 2012). Diese Signalproteine könnten durch den Kompaktierungsgrad der Nukleole in ihrer Aktivität reguliert werden, so dass sie die Expression des *HvPolI-like*-Gens in Abhängigkeit vom Verpackungsgrad steuern könnten.

Wie in Kapitel 4.2 diskutiert wurde, hat HvWHIRLY1 hauptsächlich einen Einfluss auf die Nukleoidverpackung in jungen und ausdifferenzierten Chloroplasten. Erst durch die weitere Reduktion der HvWHIRLY1-Proteinmenge unter hoher Lichtintensität ist in W1-7 auch in der Blattbasis eine erhöhte ptDNA-Menge messbar. Es ist folglich möglich, dass bereits in der Blattbasis geringe Mengen des HvWHIRLY1-Dimers vorliegen und die Kompaktierung der ptDNA ermöglichen, um z. B. die Transkription plastidärer Gene zu gewährleisten. Für diese Funktion scheint die im Schwachlicht verbleibende Menge an HvWHIRLY1 in W1-7 bereits auszureichen. Sowohl in der Blattbasis als auch der Blattspitze der Linie W1-7 hat der kurzfristige Transfer ins Hochlicht stärkere Auswirkungen auf die ptDNA-Menge als eine dauerhafte Anzucht im Hochlicht. Es ist möglich, dass durch das dauerhafte Fehlen des Hauptkompaktierungsproteins HvWHIRLY1, andere ptNAPs die Kompaktierung der Nukleole teilweise zu kompensieren versuchen, weshalb es nur zu einer leichten Erhöhung des ptDNA-Gehalts nach Anzucht im Hochlicht im Vergleich zum kurzfristigen Transfer ins Hochlicht kommt. Ein möglicher Kandidat für diese Rolle könnte SIR sein, obwohl Untersuchungen ergaben, dass SIR im Mais nicht den gleichen Effekt auf die Nukleoidkompaktierung hat wie im Tabak oder in der Erbse (Sekine et al. 2007; Kobayashi et al. 2016b). Das SIR-Protein des Mais (ZmSIR) bindet schwächer an doppelsträngige DNA als die untersuchten SIR-Proteine von dikotylen Pflanzen und kolokalisiert nicht mit den Nukleoiden (Sekine et al. 2007; Kang et al. 2010). Dennoch konnte eine schwache Kompaktierung der Nukleole durch ZmSIR nach 20 Stunden beobachtet werden (Sekine et al. 2007). Damit ist die Kompaktierungsaktivität von SIR in monokotylen Pflanzen zwar nicht so stark ausgeprägt wie in dikotylen Arten, könnte aber, bei stark reduzierter Menge an HvWHIRLY1 wie in W1-7 bei Hochlicht, eine geringe Kompaktierung der ptDNA in der Gerste aufrecht erhalten. Dafür sprechen erste Befunde, die zeigen, dass die Expression des *HvSIR*-Gens in W1-7 bei einer Anzucht der Pflanzen im Hochlicht im Vergleich zum Wildtyp erhöht ist (unveröffentlichte Daten, A. Schäfer).

4.3.2 Lichtabhängige Veränderungen in der Proteinzusammensetzung von Nukleoidfraktionen

Die Fraktionierung der Nukleole zeigte, dass sich die Proteinzusammensetzung der Nukleole nicht nur während der Entwicklung der Plastiden ändert (Majeran et al. 2012; Melonek et al. 2016), sondern auch in Abhängigkeit von unterschiedlichen Lichtbedingungen. Das WHIRLY1-Protein ist in den Nukleoidfraktionen der Gerste hauptsächlich als Monomer (27 kDa) und als potentielles Dimer (55 kDa) nachweisbar (siehe 3.3.3). Zusätzliche Banden, die HvWHIRLY1-DNA-Komplexe darstellen könnten, welche nicht durch die denaturierende SDS-PAGE aufgebrochen werden, sind zudem oberhalb von 70 kDa zu erkennen. Da das

HvWHIRLY1-Protein in den Nukleoidfraktionen stark angereichert ist, kann es als ein abundantes ptNAP in den Nukleoiden ausdifferenzierter Chloroplasten der Gerste eingestuft werden. Die durch den α -HvWHIRLY1-Antikörper detektierbaren Signale, am stärksten das Signal des Monomers und des potentiellen Dimers, nehmen bei hohen Lichtintensitäten in den Nukleoidfraktionen deutlich ab, was mit einer reduzierten Kompaktierung der Nukleoide einhergeht (siehe 4.3.1). Die beiden in den Chloroplasten nachweisbaren Proteinbanden bei etwa 35 kDa sind nicht in den Nukleoidfraktionen zu finden. Es könnte sich bei diesen beiden Banden um posttranslational modifizierte Formen des HvWHIRLY1-Proteins handeln, die außerhalb der Nukleoide in den Chloroplasten akkumulieren und bei hohen Lichtintensitäten weitestgehend vor dem Abbau geschützt sind. Auffällig ist, dass es zu einer Verschiebung des Verhältnisses von Monomer zu Dimer in den Chloroplasten und in den Nukleoidfraktionen kommt (siehe 3.3.3). In den Chloroplasten liegt deutlich mehr Monomer als Dimer vor, das bei der gewählten Exposition allerdings nicht nachweisbar ist, während sich die Menge des Dimers und des Monomers in den Nukleoidfraktionen nicht stark unterscheidet. Die Verschiebung des Verhältnisses könnte drei Gründe haben: 1. HvWHIRLY1-Monomere werden bei der Nukleoidaufarbeitung abgebaut, 2. das Dimer bildet sich erst während der Aufarbeitung oder 3. die Dimer-Bande stellt eine Kreuzreaktion des Antikörpers mit einem anderen Protein, welches während der Nukleoidpräparation angereichert wird, dar. Der dritte Punkt ist unwahrscheinlich, da das Dimer sowohl in TAC-Fraktionen von Gerste (siehe Anhang, Abb. 70) als auch im Bakterienlysate nach Überproduktion von HvWHIRLY1 in *E. coli* nachweisbar ist (siehe Anhang, Abb. 69). Darüber hinaus wird das Dimer während der nativen Aufreinigung des rekombinanten HvWHIRLY1-Proteins angereichert. Auch der zweite Punkt scheint auf Grund der unterschiedlichen Aufarbeitung der Bakterienlysate und der TAC-Fraktionen bzw. der Nukleoide unwahrscheinlich zu sein. Es ist eher denkbar, dass das Monomer durch die Lyse der Chloroplasten während der Nukleoidaufarbeitung vermehrt proteolytisch abgebaut wird. Dafür könnten Proteasen, die infolge der Nukleoidaufarbeitung freigesetzt bzw. aktiviert werden, verantwortlich sein.

Die Nukleoidfraktionen wurden vergleichend im Hinblick auf den Gehalt von drei weiteren ptNAPs untersucht. Während für MFP1 und TCP34 eine Funktion bei der Verankerung der Nukleoide an der Thylakoidmembran angenommen wird (Jeong et al. 2003; Weber et al. 2006; Melonek et al. 2016), ist pTAC12 eine Komponente der plastidär kodierten RNA Polymerase (PEP) (Pfalz et al. 2006; 2015; Melonek et al. 2016). Im Vergleich zu HvWHIRLY1 nimmt die Menge an TCP34 bei hohen Lichtintensitäten zu, während MFP1 wie HvWHIRLY1 abnimmt. Im Unterschied dazu ist keine lichtabhängige Veränderung der Menge an pTAC12 nachweisbar. TCP34 ist in der TAC-I-Fraktion bzw. in den Nukleoidfraktionen 1 nicht bzw. nur schwach, in den weiter aufgereinigten Fraktionen TAC-II und den Nukleoidfraktionen 2 stärker detektierbar (Melonek et al. 2010 und 3.3.3). Dies deutet darauf

hin, dass TCP34 eine zentrale Komponente des Nukleoids ist und auf Grund dieser Lokalisation erst während der weiteren Aufreinigung angereichert wird (Krupinska et al. 2013).

Um zu prüfen, ob die Nukleoide mit Proteinen der Thylakoidmembranen verunreinigt sind, wurden zudem Antikörper gegen Komponenten des Photosyntheseapparates, PsbA und LHCB1, verwendet. Während das PsbA-Protein, das im Reaktionszentrum des Photosystems II lokalisiert ist, nicht in der Nukleoidfraktion 1 nachweisbar ist, kann LHCB1 immunologisch detektiert werden. LHCB1 ist eine Komponente des LHCII. Proteomanalysen mit Mais zeigten ebenfalls, dass sowohl Komponenten des LHCII als auch des LHCI (*light harvesting complex I*) in den Nukleoiden zu finden sind (Majeran et al. 2012). Dabei scheint es sich um Verunreinigungen der Nukleoide zu handeln, die der engen Assoziation von Nukleoiden und Thylakoiden in ausdifferenzierten Chloroplasten geschuldet sein könnten. Unerwartet ist die Beobachtung, dass LHCB1 vermehrt im Hochlicht in den Nukleoiden akkumuliert, denn bei hohen Lichtintensitäten wird die Menge der LHC-Proteine reduziert, um keine überschüssige Lichtenergie aufzunehmen und der Entstehung von ROS entgegenzuwirken (Niyogi 2000). Eine mögliche Erklärung für die verstärkte Akkumulation von LHCB1 im Hochlicht wäre, dass bei hohen Lichtintensitäten ein Teil des LHCB1 weniger stark in der Membran verankert ist als bei Schwachlicht.

Die immunologische Untersuchung der Nukleoidfraktionen hat gezeigt, dass die plastidären Nukleoide dynamische Strukturen darstellen, die auf veränderte Umweltbedingungen mit einer Umorganisation und Veränderung der Proteinzusammensetzung reagieren. Die Umorganisation der Nukleoide könnte zu einer veränderten Genexpression sowie zu einer Aktivierung von Signalproteinen, die an der retrograden Signalweiterleitung an den Zellkern beteiligt sind, führen.

4.4 Funktionelle Unterschiede zwischen den plastidären WHIRLY-Proteinen verschiedener Arten

Obwohl die plastidären WHIRLY-Proteine verschiedener Arten eine große Sequenzähnlichkeit zueinander aufweisen, scheinen sie sich in ihrer Funktion in den Plastiden erheblich zu unterscheiden. Während die monokotylen WHIRLY1-Proteine der Gerste und des Mais als Kompaktierungsproteine der plastidären Nukleoide fungieren (siehe 4.1.1), sind die plastidären WHIRLY-Proteine von Arabidopsis als Anti-Rekombinationsproteine beschrieben (Maréchal et al. 2009; Cappadocia et al. 2010) und nicht in der Lage die Nukleoide in *E. coli* zu kompaktieren (siehe 4.1.2).

Darüber hinaus konnte in der Gerste beobachtet werden, dass die Primärblätter der WHIRLY1-RNAi-Linien im Vergleich zum Wildtyp eine hellere Blattspreite aufweisen (siehe 3.3.1). Im Schwachlicht ist bereits eine leichte Aufhellung zu erkennen, die sich bei hoher Lichtintensität stärker ausprägt und direkt mit der Menge des HvWHIRLY1-Proteins korreliert. Während die Aufhellung bei hoher Lichtintensität auf einen photooxidativen Stress zurückzuführen ist (siehe 4.3.1), könnte die hellere Blattspreite im Schwachlicht, die während der weiteren Entwicklung zurückgeht, auf eine verzögerte Chloroplastenentwicklung hindeuten (siehe 3.3.1). Dies könnte für eine Beteiligung von HvWHIRLY1 an der Biogenese der Chloroplasten sprechen. Deshalb stellt sich die Frage, ob auch in anderen Arten ein Zusammenhang zwischen der WHIRLY1-Proteinmenge und der Entwicklung der Chloroplasten besteht. Eine *whirly1*-Mutante des Mais zeigt einen Albino-Phänotyp, der auf eine Defizienz an plastidären Ribosomen zurückgeführt wird (Prikryl et al. 2008). Die fehlende Kompaktierungsaktivität von WHIRLY1 in den WHIRLY1-defizienten Mutanten der Gerste und des Mais könnte durch eine veränderte Genexpression zu Störungen der plastidären Ribosomen führen, was eine hellere bzw. weiße Blattspreite bewirkt. Von diesen Störungen scheint die *whirly1*-Mutante des Mais stärker betroffen zu sein als die WHIRLY1-RNAi-Linien der Gerste. Im Unterschied zur Gerste und zum Mais, in denen ein Zusammenhang zwischen der Chloroplastenentwicklung und dem WHIRLY1-Protein infolge von Störungen in den Ribosomen bestehen könnte, scheint die Chloroplastenentwicklung in Arabidopsis dagegen nicht mit den plastidären WHIRLY-Proteinen zusammenzuhängen. Im Vergleich zum Wildtyp führte das Fehlen nur eines der beiden plastidären WHIRLY-Proteine zu keiner veränderten Chloroplastenentwicklung (Yoo et al. 2007; Isemer 2013). Es wurde diskutiert, dass AtWHIRLY1 und AtWHIRLY3 durch ihre hohe Sequenzhomologie ähnliche Funktionen in den Chloroplasten besitzen könnten, so dass erst eine *whirly1/3*-Doppelmutante durch das Fehlen beider Proteine einen Phänotyp zeigen könnte (Isemer 2013). Allerdings wurden variierte Blattbereiche, die mit einer vermehrten Rekombination der ptDNA einhergingen, nur in 4,6 % der *whirly1/3*-Doppelmutanten beobachtet (Maréchal et al. 2009). Die Variegationen in der *whirly1/3*-Doppelmutante waren bei hoher Lichtintensität stärker ausgeprägt als im Schwachlicht (Isemer 2013). Auch in der Gerste führen hohe Lichtintensitäten zu einer stärkeren Ausprägung des Phänotyps. Es ist wahrscheinlich, dass allen plastidären WHIRLY-Proteinen eine Funktion bei der Stressantwort infolge von Hochlicht zukommen könnte (siehe Kapitel 4.3.1), während die Kompaktierung der plastidären Nukleotide auf die PRAPP-enthaltenden monokotylen WHIRLY1-Proteine beschränkt ist.

4.5 Schlussfolgerung

Außer WHIRLY1 der Gerste sind bis heute in Höheren Pflanzen nur zwei weitere ptNAPs, die als Kompaktierungsproteine der plastidären Nukleoide klassifiziert werden können, bekannt: SIR und SWIB-4. Für das SIR-Protein konnte experimentell eine Kompaktierungsaktivität in verschiedenen Höheren Pflanzen, *G. max* (Cannon et al. 1999), *P. sativum* (Sekine et al. 2007) und *N. benthamiana* (Kang et al. 2010) ermittelt werden. Darüber hinaus konnte SIR in den Nukleoiden von *N. tabacum* und im Moos *Physcomitrella patens* (*P. patens*) nachgewiesen werden (Jeong et al. 2003; Wiedemann et al. 2010). SIR kann wie WHIRLY1 sowohl an einzel- als auch an doppelsträngige DNA binden, wobei die Bindung unabhängig von der Sequenz erfolgt (Sekine et al. 2007; Prikryl et al. 2008). Auf Grund dieser Befunde wurde angenommen, dass SIR ein universelles Kompaktierungsprotein der Nukleoide in Höheren Pflanzen darstellt. Neuere Untersuchungen ergaben jedoch, dass dies nicht der Fall ist. Es konnte gezeigt werden, dass der für die Kompaktierungsaktivität von SIR verantwortliche C-terminale Peptidbereich (CEP, *C-terminally encoded peptide*) nicht in allen SIR-Proteinen zu finden ist (Kobayashi et al. 2016b). So fehlt CEP in monokotylen SIR-Proteinen und in SIR-Proteinen der Brassicaceae. SIR konnte nicht in Nukleoidfraktionen oder in TAC-Fraktionen von Mais und Arabidopsis nachgewiesen werden, was zudem gegen eine Funktion als Kompaktierungsprotein in diesen beiden Arten spricht (Pfalz et al. 2006; Majeran et al. 2012; Huang et al. 2013). Demnach sind die SIR-Proteine in monokotylen Pflanzenarten sowie in den Brassicaceae nicht oder nur schwach (siehe auch Kapitel 4.3.1) als Kompaktierungsprotein wirksam (Kobayashi et al. 2016b). Für die CEP-Sequenz wird ein bakterielles *ribbon-helix-helix* DNA-Bindemotiv vorhergesagt, über das die Interaktion mit plastidären Nukleoiden erfolgen kann. CEP-enthaltende SIR-Proteine sind weit verbreitet und kommen in Cyanobakterien, Rotalgen, in einigen Grünalgen sowie in zahlreichen dikotylen Pflanzenarten vor (Kobayashi et al. 2016b). Das Vorhandensein von CEP geht aber nicht immer mit einer Lokalisation von SIR in den Nukleoiden einher wie z. B. im Fall des Cyanobakteriums *Anabaena variabilis* (*A. variabilis*) und der Rotalge *C. merolae* (Sato et al. 2004; Kobayashi et al. 2016b). Die Kompaktierung der Nukleoide erfolgt in diesen Organismen wahrscheinlich durch ein HU-Protein bzw. durch ein zu HU homologes Protein (Kobayashi et al. 2002; Sato et al. 2004). Im Unterschied dazu besitzen Höhere Pflanzen keine NAPs prokaryotischen Ursprungs, weshalb eukaryotische Proteine die Kompaktierung der Nukleoide bewerkstelligen müssen (Sato et al. 2004; Kobayashi et al. 2016b), so dass sich SIR und andere eukaryotische Proteine erst bei Verlust der bakteriellen NAPs als Kompaktierungsproteine etablieren konnten. Das erste nukleoidassoziierte SIR-Protein findet man im Moos *P. patens* (Kobayashi et al. 2016b). Während der Evolution haben einige Höhere Pflanzen die CEP-Sequenz innerhalb des SIR-Proteins unabhängig voneinander

verloren, was die SIR-Proteine ohne bzw. mit schwacher Kompaktierungsaktivität innerhalb der monokotylen Pflanzen sowie innerhalb der Brassicaceae erklärt.

Die Kompaktierungsaktivität von SIR könnte durch das WHIRLY1-Protein in den Poaceae und durch die SWIB-Proteine in Arabidopsis (möglicherweise in allen Brassicaceae) übernommen worden sein. Phylogenetische Analysen zeigen, dass WHIRLY-ähnliche Proteine außerhalb der Angiospermen in *C. reinhardtii*, *K. flaccidum* und *M. polymorpha* zu finden sind, jedoch nicht in Cyanobakterien (Kobayashi et al. 2016a). Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die WHIRLY-Proteine eukaryotischen Ursprungs sind. Es wird hier ausdrücklich die Bezeichnung WHIRLY-ähnliche Proteine und nicht WHIRLY-Proteine gewählt, da die WHIRLY-ähnlichen Proteine nicht das typische Nukleinsäure-Bindemotiv (KGKAAAL) besitzen und zudem eine geringere Sequenzähnlichkeit zu den WHIRLY-Proteinen der Höheren Pflanzen aufweisen. Zusätzlich fehlt den WHIRLY-ähnlichen Proteinen wie den dikotylen WHIRLY1-Proteinen das PRAPP-Motiv (Kobayashi et al. 2016a). Die Kompaktierungsaktivität des WHIRLY1-Proteins scheint somit, wie zuvor beschrieben (siehe Kapitel 4.1.2 und 4.1.3), auf die Proteine der Poaceae beschränkt zu sein. Eine mögliche Erklärung könnte der Zusammenhang zwischen der Replikation und der Transkription in monokotylen Pflanzen wie der Gerste sein. Im Zuge der Chloroplastenentwicklung nimmt die Replikation der ptDNA ab, während die Transkriptionsaktivität steigt (Sato et al. 2003; Sakai et al. 2004). Einhergehend mit dieser Funktionsverschiebung kommt es zur Kompaktierung der Nukleole durch HvWHIRLY1 (siehe 4.2), so dass HvWHIRLY1 an der Abstimmung von Replikation und Transkription während der Chloroplastenentwicklung beteiligt sein könnte. Ob es auch in dikotylen Arten zu einer Abstimmung von Replikation und Transkription kommt, ist noch offen.

SWIB-Proteine konnten in den TAC-Fractionen von Spinat und Gerste identifiziert werden (Melonek et al. 2012). Für das SWIB-4-Protein von Arabidopsis konnte bisher nur in *E. coli* ein kompaktierender Effekt auf die Nukleole gezeigt werden. Der Nachweis, dass SWIB-4 auch *in planta* die Kompaktierung der Nukleole beeinflusst, steht noch aus. SWIB-4 von Arabidopsis besitzt eine Histon H1-ähnliche Domäne (*histone H1-like domain*) und ist in der Lage die Funktion des H-NS-Proteins in einer *hns-E. coli*-Mutante zu übernehmen (Melonek et al. 2012). Eine Histon H1-ähnliche Domäne existiert in den SWIB-Proteinen der Gerste jedoch nicht (Oetke 2011), so dass SWIB-Proteine in der Gerste vermutlich nicht als Kompaktierungsproteine fungieren. Da in Arabidopsis weder das SIR-Protein (Kobayashi et al. 2016a) noch die beiden plastidären WHIRLY-Proteine eine Kompaktierungsaktivität (siehe 3.2.4) besitzen, könnte sich das SWIB-4-Protein als alleiniges Kompaktierungsprotein in Arabidopsis entwickelt haben.

Höhere Pflanzen besitzen somit kein universelles Kompaktierungsprotein für die plastidären Nukleole. Obwohl alle Höheren Pflanzen über SIR-, WHIRLY- sowie SWIB-Proteine

verfügen, hat sich vermutlich jeweils nur eines dieser Proteine als Kompaktierungsprotein für die plastidären Nukleioide durchgesetzt. Interessanterweise haben die drei Kompaktierungsproteine unterschiedliche Auswirkungen auf die Funktionalität der Nukleioide. Während die Nukleoidkompaktierung durch SIR sowohl die Replikation als auch die Transkription inhibiert (Cannon et al. 1999; Sekine et al. 2002; 2007), hemmt HvWHIRLY1 nur die Replikation und wirkt jedoch fördernd auf die Transkription (siehe 4.2). Außerdem kann SWIB-4 eine *hns*-Mutante komplementieren (Melonek et al. 2012), während die Komplementation der *hns*-Mutante durch HvWHIRLY1 nicht möglich ist (siehe 3.2.1).

4.6 Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass das HvWHIRLY1-Protein sowohl plastidäre Nukleioide der Gerste als auch Nukleioide in *E. coli* kompaktiert. Mit Hilfe von heterologen Expressionsstudien konnte innerhalb des HvWHIRLY1-Proteins das PRAPP-Motiv als verantwortlich für die Kompaktierung der Nukleioide in *E. coli* identifiziert werden.

Zukünftig ist zu prüfen, ob das PRAPP-Motiv auch *in planta* die Nukleoidkompaktierung bewirkt. Hierzu können transgene Gerstenpflanzen, welche ein im PRAPP-Motiv mutiertes WHIRLY1-Protein aufweisen, untersucht werden. Darüber hinaus kann die innerhalb des PRAPP-Motivs mutierte *HvWHIRLY1*-Sequenz (*HvWHIRLY1*Δ*PRAPP*) bzw. die Sequenz für das chimäre AtWHIRLY1+PRAPP-Protein für transiente Ansätze mit Protoplasten genutzt werden.

Zur Klärung weiterer Fragen bezüglich der Evolution des PRAPP-Motivs in monokotylen Pflanzen, der Funktion zusätzlicher Proline nach dem PRAPP-Motiv sowie der Rolle eines Dimers für die Kompaktierungsaktivität können heterologe Expressionsstudien mit mutierten *HvWHIRLY1*-Sequenzen bzw. mit *WHIRLY1*-Sequenzen aus anderen Arten in *E. coli* durchgeführt werden.

Bei der immunologisch mit dem α-HvWHIRLY1-Antikörper nachweisbaren Proteinbande bei 55 kDa könnte es sich um ein HvWHIRLY1-Dimer handeln, was massenspektrometrisch überprüft werden müsste. Um eine mögliche Beteiligung von Polyaminen bei der Ausbildung des Dimers zu klären, wäre eine Hydrolyse des potentiellen Dimers und eine Untersuchung mittels HPLC notwendig.

HvWHIRLY1 wirkt vornehmlich in jungen und ausdifferenzierten Chloroplasten der Blattmitte und -spitze eines Gerstenprimärblattes als Kompaktierungsprotein. Um zu prüfen, ob und in welcher Form HvWHIRLY1 in der Blattbasis mit den Nukleoiden assoziiert ist, wären immunologische Analysen von Nukleoidfraktionen aus dem basalen Blattsegment geeignet.

In den Chloroplasten und Nukleoidfraktionen konnte eine Verschiebung des Verhältnisses zwischen der monomeren und der dimeren Form des HvWHIRLY1-Proteins beobachtet werden. Durch Anwesenheit von Protease-Inhibitoren während der Nukleoidpräparation könnte getestet werden, ob die Verschiebung durch einen Abbau des Monomers zustande gekommen ist. Detaillierte Subfraktionierungen der Chloroplasten können zudem zeigen, wo die in den Chloroplasten nachgewiesenen Mengen des HvWHIRLY1-Monomers lokalisiert sind.

5 Zusammenfassung

In den Plastiden liegt die DNA (ptDNA) in Form von DNA-Protein-Strukturen vor, die in Anlehnung an die Organisation bakterieller DNA als Nukleoide bezeichnet werden. Ein abundantes Protein plastidärer Nukleoide Höherer Pflanzen ist WHIRLY1.

In der vorliegenden Arbeit wurde das WHIRLY1-Protein der Gerste (HvWHIRLY1) als Kompaktierungsprotein für die plastidären Nukleoide in jungen und ausdifferenzierten Chloroplasten identifiziert. Untersuchungen zur Nukleoidmorphologie in transgenen Gerstenlinien, in denen die Menge an HvWHIRLY1 durch RNAi reduziert ist, zeigten, dass eine Teilpopulation der Nukleoide im Vergleich zu den Nukleoiden des Wildtyps deutlich vergrößert ist und damit einhergehend einen verringerten Kompaktierungsgrad aufweist. Die kompaktierende Wirkung des HvWHIRLY1-Proteins auf die Nukleoide wurde außerdem mit heterologen Expressionsstudien in *E. coli* bestätigt. Auch das WHIRLY1-Protein des Mais bewirkt eine stärkere Verpackung der bakteriellen Nukleoide, während die plastidären WHIRLY-Proteine von Arabidopsis diese Funktion nicht besitzen. Die Wirkung als Kompaktierungsprotein ist auf ein kurzes Motiv am N-Terminus der monokotylen WHIRLY1-Proteine, das PRAPP-Motiv, zurückzuführen, das ausschließlich in den WHIRLY1-Proteinen aus der Familie der Poaceae zu finden ist. Diese Befunde deuten auf einen funktionellen Unterschied zwischen den plastidären WHIRLY-Proteinen der monokotylen und dikotylen Pflanzenarten hin. Die transgenen WHIRLY1-RNAi-Linien weisen zudem einen erhöhten Gehalt an ptDNA in ausdifferenzierten Chloroplasten auf, was auf eine erhöhte Replikationsaktivität hinweist. HvWHIRLY1 scheint die Replikation über die Nukleoidverpackung, welche die Zugänglichkeit der ptDNA für die Replikationsmaschinerie beeinflusst, zu steuern.

Im Wildtyp sowie in den transgenen WHIRLY1-RNAi-Linien unterliegt die HvWHIRLY1-Proteinmenge entwicklungsabhängigen und umweltabhängigen Schwankungen. Die lichtinduzierte Reduktion des HvWHIRLY1-Proteins führt in den transgenen WHIRLY1-RNAi-Linien zu photooxidativem Stress. Das HvWHIRLY1-Protein scheint daher auch eine Rolle bei der Anpassung der Pflanze an Stressbedingungen zu spielen.

5 Summary

The DNA of plastids (ptDNA) is organized as DNA-protein-structures, which were designated as nucleoids with regard to bacterial nucleoids. An abundant protein of plastid nucleoids in higher plants is WHIRLY1.

In the present work the WHIRLY1 protein of barley (HvWHIRLY1) was identified as a nucleoid compacting protein in young and mature chloroplasts. The investigation of the nucleoid morphology in transgenic barley lines, that have an RNAi-mediated reduction of the HvWHIRLY1 protein level, revealed that a subpopulation of nucleoids is enlarged and less condensed in comparison to wild type nucleoids. Heterologous expression of *HvWHIRLY1* in *E. coli* confirmed that the HvWHIRLY1 protein has a function in compacting nucleoids. As well the WHIRLY1 protein of maize leads to an enhanced packaging of bacterial nucleoids, whereas plastid WHIRLY proteins of Arabidopsis have no impact on nucleoid compaction. The nucleoid compacting WHIRLY1 proteins in the family of Poaceae have a short N-terminal motif, the PRAPP-motif. These findings indicate functional differences between plastid WHIRLY proteins of monocots and dicots. Moreover, the transgenic WHIRLY1-RNAi lines contain an enhanced ptDNA content in mature chloroplasts indicating an enhanced plastid replication activity. By its impact on the structure of nucleoids HvWHIRLY1 seems to regulate the accessibility of ptDNA to the replication machinery of plastids.

Accumulation of the HvWHIRLY1 protein depends on development-dependent and environment-dependent cues both in the wild type and the transgenic WHIRLY1-RNAi lines. The light-induced reduction of the HvWHIRLY1 protein leads to photooxidative stress in the transgenic WHIRLY1-RNAi lines. Therefore, the HvWHIRLY1 protein seems to play a role in plant acclimation to stress conditions.

6 Literaturverzeichnis

- Adamson, H.Y., Hiller, R.G. & Walmsley, J. (1997). Protochlorophyllide reduction and greening in angiosperms: an evolutionary perspective. *J Photochem Photobiol B: Biol*, 41: 201–221.
- Allen, J.F. (2015). Why chloroplasts and mitochondria retain their own genomes and genetic systems: Colocation for redox regulation of gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA*, 112: 10231–10238.
- Azam, T.A., Iwata, A., Nishimura, A., Ueda, S. & Ishihama, A. (1999). Growth phase-dependent variation in protein composition of the *Escherichia coli* nucleoid. *J Bacteriol*, 181: 6361–6370.
- Backert, S., Lurz, R., Oyarzabal, O.A. & Börner, T. (1997). High content, size and distribution of single-stranded DNA in the mitochondria of *Chenopodium album* (L.). *Plant Mol Biol*, 33: 1037–1050.
- Bais, H.P. & Ravishankar, G.A. (2002). Role of polyamines in the ontogeny of plants and their biotechnological applications. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 69: 1–34.
- Baumgartner, B.J., Rapp, J.C. & Mullet, J.E. (1989). Plastid transcription activity and DNA copy number increase early in barley chloroplast development. *Plant Physiol*, 89: 1011–1018.
- Berger, M., Farcas, A., Geertz, M., Zhelyazkova, P., Brix, K., Travers, A. & Muskhelishvili, G. (2009). Coordination of genomic structure and transcription by the main bacterial nucleoid-associated protein HU. *EMBO Rep*, 11: 59–64.
- Berthold, V. & Geider, K. (1976). Interaction of DNA with DNA-binding proteins. The characterization of protein HD from *Escherichia coli* and its nucleic acid complexes. *Eur J Biochem*, 71: 443–449.
- Betts, M.J. & Russell, R.B. (2003). Amino acid properties and consequences of substitutions. In: *Bioinformatics for Geneticists*, eds. Barnes, M.R. & Gray, I.C. (Chichester: John Wiley & Sons Ltd.), 289–314.
- Birnboim, H.C. & Doly, J. (1979). A rapid extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, 7: 1513–1523.
- Bogenhagen, D.F. (2012). Mitochondrial DNA nucleoid structure. *Biochim Biophys Acta*, 1819: 914–920.
- Bouvier, F., Backhaus, R.A. & Camara, B. (1998). Induction and control of chromoplast-specific carotenoid genes by oxidative stress. *J Biol Chem*, 273: 30651–30659.

- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72: 248–254.
- Bredemeier, R., Schlegel, T., Ertel, F., Vojta, A., Borissenko, L., Bohnsack, M.T., Groll, M., Haeseler, von, A. & Schleiff, E. (2007). Functional and phylogenetic properties of the pore-forming beta-barrel transporters of the Omp85 family. *J Biol Chem*, 282: 1882–1890.
- Brescia, C.C., Kaw, M.K. & Sledjeski, D.D. (2004). The DNA binding protein H-NS binds to and alters the stability of RNA in vitro and in vivo. *J Mol Biol*, 339: 505–514.
- Broyles, S.S. & Pettijohn, D.E. (1986). Interaction of the *Escherichia coli* HU protein with DNA. Evidence for formation of nucleosome-like structures with altered DNA helical pitch. *J Mol Biol*, 187: 47–60.
- Cai, Q., Guo, L., Shen, Z.R., Wang, D.Y., Zhang, Q. & Sodmergen. (2015). Elevation of pollen mitochondrial DNA copy number by WHIRLY2: altered respiration and pollen tube growth in Arabidopsis. *Plant Physiol*, 169: 660–673.
- Campos, E.I. & Reinberg, D. (2009). Histones: annotating chromatin. *Annu Rev Genet*, 43: 559–599.
- Cannon, G.C., Ward, L.N., Case, C.I. & Heinhorst, S. (1999). The 68 kDa DNA compacting nucleoid protein from soybean chloroplasts inhibits DNA synthesis in vitro. *Plant Mol Biol*, 39: 835–845.
- Cappadocia, L., Maréchal, A., Parent, J.S., Lepage, E., Sygusch, J. & Brisson, N. (2010). Crystal structures of DNA-Whirly complexes and their role in Arabidopsis organelle genome repair. *Plant Cell*, 22: 1849–1867.
- Cappadocia, L., Parent, J.S., Zampini, E., Lepage, E., Sygusch, J. & Brisson, N. (2012). A conserved lysine residue of plant Whirly proteins is necessary for higher order protein assembly and protection against DNA damage. *Nucleic Acids Res*, 40: 258–269.
- Caramel, A. & Schnetz, K. (1998). Lac and lambda repressors relieve silencing of the *Escherichia coli* bgl promoter. Activation by alteration of a repressing nucleoprotein complex. *J Mol Biol*, 284: 875–883.
- Chaly, N. & Possingham, J.V. (1981). Structure of constricted proplastids in meristematic plant tissues. *Biol Cell*, 41: 203–210.
- Chan, Y.H., Kwok, A.C.M., Tsang, J.S.H. & Wong, J.T.Y. (2006). Alveolata histone-like proteins have different evolutionary origins. *J Evol Biol*, 19: 1717–1721.
- Chan, K.X., Phua, S.Y., Crisp, P., McQuinn, R. & Pogson, B.J. (2016). Learning the languages of the chloroplast: retrograde signaling and beyond. *Annu Rev Plant Biol*, 67: 25–53.

- Christensen, A.C., Lyznik, A., Mohammed, S., Elowsky, C.G., Elo, A., Yule, R. & Mackenzie, S.A. (2005). Dual-domain, dual-targeting organellar protein presequences in Arabidopsis can use non-AUG start codons. *Plant Cell*, 17: 2805–2816.
- Claret, L. & Rouvière-Yaniv, J. (1997). Variation in HU composition during growth of *Escherichia coli*: the heterodimer is required for long term survival. *J Mol Biol*, 273: 93–104.
- Cohen, S.N., Chang, A.C.Y. & Hsu, L. (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *E. coli* by R-factor-DNA. *PNAS*, 69: 2110–2114.
- Dame, R.T. (2005). The role of nucleoid-associated proteins in the organization and compaction of bacterial chromatin. *Mol Microbiol*, 56: 858–870.
- Dehesh, K., Klaas, M., Häuser, I. & Apel, K. (1986). Light-induced changes in the distribution of the 36000-Mr polypeptide of NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase within different cellular compartments of barley (*Hordeum vulgare* L.): I. Localization by immunoblotting in isolated plastids and total leaf extracts. *Planta*, 169: 162–171.
- Del Duca, S., Beninati, S. & Serafini-Fracassini, D. (1995). Polyamines in chloroplasts: identification of their glutamyl and acetyl derivatives. *Biochem J*, 305: 233–237.
- Del Duca, S. & Serafini-Fracassini, D. (2005). Transglutaminases of higher, lower plants and fungi. *Prog Exp Tumor Res*, 38: 223–247.
- Dempsey, D.A., Vlot, A.C., Wildermuth, M.C. & Klessig, D.F. (2011). Salicylic acid biosynthesis and metabolism. *The Arabidopsis Book*, 9: e0156.
- Després, C., Subramaniam, R., Matton, D.P. & Brisson, N. (1995). The activation of the potato PR-10a gene requires the phosphorylation of the nuclear factor PBF-1. *Plant Cell*, 7: 589–598.
- Després, C., Chubak, C., Rochon, A., Clark, R., Bethune, T., Desveaux, D. & Fobert, P.R. (2003). The Arabidopsis NPR1 disease resistance protein is a novel cofactor that confers redox regulation of DNA binding activity to the basic domain/leucine zipper transcription factor TGA1. *Plant Cell*, 15: 2181–2191.
- Desveaux, D., Després, C., Joyeux, A., Subramaniam, R. & Brisson, N. (2000). PBF-2 is a novel single-stranded DNA binding factor implicated in PR-10a gene activation in potato. *Plant Cell*, 12: 1477–1489.
- Desveaux, D., Allard, J., Brisson, N. & Sygusch, J. (2002). A new family of plant transcription factors displays a novel ssDNA-binding surface. *Nat Struct Biol*, 9: 512–517.
- Desveaux, D., Subramaniam, R., Després, C., Mess, J.N., Lévesque, C., Fobert, P.R., Dangl, J.L. & Brisson, N. (2004). A “Whirly” transcription factor is required for salicylic acid-dependent disease resistance in Arabidopsis. *Dev Cell*, 6: 229–240.
- Desveaux, D., Maréchal, A. & Brisson, N. (2005). Whirly transcription factors: defense gene regulation and beyond. *Trends Plant Sci*, 10: 95–102.

- Dietz, K.J. (2015). Efficient high light acclimation involves rapid processes at multiple mechanistic levels. *J Exp Bot*, 66: 2401–2414.
- Dietz, K.J. & Pfannschmidt, T. (2011). Novel regulators in photosynthetic redox control of plant metabolism and gene expression. *Plant Physiol*, 155: 1477–1485.
- Dillon, S.C. & Dorman, C.J. (2010). Bacterial nucleoid-associated proteins, nucleoid structure and gene expression. *Nat Rev Microbiol*, 8: 185–195.
- Dondini, L., Del Duca, S., Dall'Agata, L., Bassi, R., Gastaldelli, M., Mea, Della, M., Di Sandro, A., Claparols, I. & Serafini-Fracassini, D. (2003). Suborganellar localisation and effect of light on *Helianthus tuberosus* chloroplast transglutaminases and their substrates. *Planta*, 217: 84–95.
- Duy, D., Soll, J. & Philippar, K. (2007). Solute channels of the outer membrane: from bacteria to chloroplasts. *Biol Chem*, 388: 879–889.
- Folk, J.E. (1980). Transglutaminases. *Annu Rev Biochem*, 49: 517–531.
- Foyer, C.H., Lelandais, M. & Kunert, K.J. (1994). Photooxidation in plants. *Physiol Plant*, 92: 696–717.
- Foyer, C.H., Karpinska, B. & Krupinska, K. (2014). The functions of WHIRLY1 and REDOX-RESPONSIVE TRANSCRIPTION FACTOR 1 in cross tolerance responses in plants: a hypothesis. *Philos Trans R Soc Lond, B, Biol Sci*, 369: 20130226.
- Fulton, T.M., Chunwongse, J. & Tanksley, S.D. (1995). Microprep protocol for extraction of DNA from tomato and other herbaceous plants. *Plant Mol Biol Rep*, 13: 207–209.
- Gaffney, T., Friedrich, L., Vernooij, B., Negrotto, D., Nye, G., Uknes, S., Ward, E., Kessmann, H. & Ryals, J. (1993). Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science*, 261: 754–756.
- Grabowski, E. (2008). Isolierung, Charakterisierung und funktionelle Analyse der Whirly-Proteine der Gerste (*Hordeum vulgare* L.). Dissertation, Universität Kiel.
- Grabowski, E., Miao, Y., Mulisch, M. & Krupinska, K. (2008). Single-stranded DNA-binding protein Whirly1 in barley leaves is located in plastids and the nucleus of the same cell. *Plant Physiol*, 147: 1800–1804.
- Gray, M.W. (1989). The evolutionary origins of organelles. *Trends Genet*, 5: 294–299.
- Gualberto, J.M. & Kühn, K. (2014). DNA-binding proteins in plant mitochondria: implications for transcription. *Mitochondrion*, 19 Pt B: 323–328.
- Han, Y.J., Song, P.S. & Kim, J.I. (2007). Phytochrome-mediated photomorphogenesis in plants. *J Plant Biol*, 50: 230–240.
- Hatahet, F., Boyd, D. & Beckwith, J. (2014). Disulfide bond formation in prokaryotes: history, diversity and design. *Biochim Biophys Acta*, 1844: 1402–1414.

- Hideg, E., Barta, C., Kálai, T., Vass, I., Hideg, K. & Asada, K. (2002). Detection of singlet oxygen and superoxide with fluorescent sensors in leaves under stress by photoinhibition or UV radiation. *Plant Cell Physiol*, 43: 1154–1164.
- Huang, C.Y., Ayliffe, M.A. & Timmis, J.N. (2003). Direct measurement of the transfer rate of chloroplast DNA into the nucleus. *Nature*, 422: 72–76.
- Huang, M., Friso, G., Nishimura, K., Qu, X., Olinares, P.D.B., Majeran, W., Sun, Q. & van Wijk, K.J. (2013). Construction of plastid reference proteomes for maize and Arabidopsis and evaluation of their orthologous relationships; the concept of orthoproteomics. *J Proteome Res*, 12: 491–504.
- Isemer, R. (2013). Die WHIRLY-Proteine von *Arabidopsis thaliana*. Dissertation, Universität Kiel.
- Isemer, R., Mulisch, M., Schäfer, A., Kirchner, S., Koop, H.-U. & Krupinska, K. (2012). Recombinant Whirly1 translocates from transplastomic chloroplasts to the nucleus. *FEBS Lett*, 586: 85–88.
- Jarvis, P. & López-Juez, E. (2013). Biogenesis and homeostasis of chloroplasts and other plastids. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 14: 787–802.
- Jeong, S.Y., Rose, A. & Meier, I. (2003). MFP1 is a thylakoid-associated, nucleoid-binding protein with a coiled-coil structure. *Nucleic Acids Res*, 31: 5175–5185.
- Juneau, P., Le Lay, P., Böddi, B., Samson, G. & Popovic, R. (2002). Relationship between the structural and functional changes of the photosynthetic apparatus during chloroplast-chromoplast transition in flower bud of *Lilium longiflorum*. *Photochem Photobiol*, 75: 377–381.
- Kabeya, Y., Nakanishi, H., Suzuki, K., Ichikawa, T., Kondou, Y., Matsui, M. & Miyagishima, S.Y. (2010). The YlmG protein has a conserved function related to the distribution of nucleoids in chloroplasts and cyanobacteria. *BMC Plant Biol*, 10: 57.
- Kamashev, D., Balandina, A. & Rouvière-Yaniv, J. (1999). The binding motif recognized by HU on both nicked and cruciform DNA. *EMBO J*, 18: 5434–5444.
- Kang, Y.W., Lee, J.Y., Jeon, Y., Cheong, G.W., Kim, M. & Pai, H.S. (2010). In vivo effects of NbSiR silencing on chloroplast development in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Mol Biol*, 72: 569–583.
- Karcher, D., Köster, D., Schadach, A., Klevesath, A. & Bock, R. (2009). The *Chlamydomonas* chloroplast HLP protein is required for nucleoid organization and genome maintenance. *Mol Plant*, 2: 1223–1232.
- Kilbienski, I. (2007). Untersuchungen zur Funktion und Regulation des seneszenzassoziierten HvS40-Genes der Gerste (*Hordeum vulgare* L.) und HvS40 verwandter Gene von *Arabidopsis thaliana*. Dissertation, Universität Kiel.

- Kim, M., Christopher, D.A. & Mullet, J.E. (1993). Direct evidence for selective modulation of *psbA*, *rpoA*, *rbcL* and 16S RNA stability during barley chloroplast development. *Plant Mol Biol*, 22: 447–463.
- Kimura, S., Uchiyama, Y., Kasai, N., Namekawa, S., Saotome, A., Ueda, T., Ando, T., Ishibashi, T., Oshige, M., Furukawa, T., Yamamoto, T., Hashimoto, J. & Sakaguchi, K. (2002). A novel DNA polymerase homologous to *Escherichia coli* DNA polymerase I from a higher plant, rice (*Oryza sativa* L.). *Nucleic Acids Res*, 30: 1585–1592.
- Kindgren, P., Kremnev, D., Blanco, N.E., de Dios Barajas López, J., Fernández, A.P., Tellgren-Roth, C., Kleine, T., Small, I. & Strand, A. (2012). The plastid redox insensitive 2 mutant of *Arabidopsis* is impaired in PEP activity and high light-dependent plastid redox signalling to the nucleus. *Plant J*, 70: 279–291.
- Klein, R.R. & Mullet, J.E. (1986). Regulation of chloroplast-encoded chlorophyll-binding protein translation during higher plant chloroplast biogenesis. *J Biol Chem*, 261: 11138–11145.
- Kobayashi, T., Takahara, M., Miyagishima, S.Y., Kuroiwa, H., Sasaki, N., Ohta, N., Matsuzaki, M. & Kuroiwa, T. (2002). Detection and localization of a chloroplast-encoded HU-like protein that organizes chloroplast nucleoids. *Plant Cell*, 14: 1579–1589.
- Kobayashi, Y., Takusagawa, M., Harada, N., Fukao, Y., Yamaoka, S., Kohchi, T., Hori, K., Ohta, H., Shikanai, T. & Nishimura, Y. (2016a). Eukaryotic components remodeled chloroplast nucleoid organization during the green plant evolution. *Genome Biol Evol*, 8: 1–16.
- Kobayashi, Y., Otani, T., Ishibashi, K., Shikanai, T. & Nishimura, Y. (2016b). C-Terminal region of sulfite reductase is important to localize to chloroplast nucleoids in land plants. *Genome Biol Evol*, 8: 1459–1466.
- Kodama, Y. (2007). Plastidic proteins containing motifs of nuclear transcription factors. *Plant Biotech*, 24: 165–170.
- Kolodner, R. & Tewari, K.K. (1975). The molecular size and conformation of the chloroplast DNA from higher plants. *Biochim Biophys Acta*, 402: 372–390.
- Koussevitzky, S., Nott, A., Mockler, T.C., Hong, F., Sachetto-Martins, G., Surpin, M., Lim, J., Mittler, R. & Chory, J. (2007). Signals from chloroplasts converge to regulate nuclear gene expression. *Science*, 316: 715–719.
- Krause, K. & Krupinska, K. (2000). Molecular and functional properties of highly purified transcriptionally active chromosomes from spinach chloroplasts. *Physiol Plant*, 109: 188–195.
- Krause, K., Kilbiński, I., Mulisch, M., Rödiger, A., Schäfer, A. & Krupinska, K. (2005). DNA-binding proteins of the Whirly family in *Arabidopsis thaliana* are targeted to the organelles. *FEBS Lett*, 579: 3707–3712.

- Krupinska, K. & Falk, J. (1994). Changes in RNA-polymerase activity during biogenesis, maturation and senescence of barley chloroplasts. Comparative analysis of transcripts synthesized either in run-on assays or by transcriptionally active chromosomes. *J Plant Physiol*, 143: 298–305.
- Krupinska, K., Melonek, J. & Krause, K. (2013). New insights into plastid nucleoid structure and functionality. *Planta*, 237: 653–664.
- Krupinska, K., Oetke, S., Desel, C., Mulisch, M., Schäfer, A., Hollmann, J., Kumlehn, J. & Hensel, G. (2014a). WHIRLY1 is a major organizer of chloroplast nucleoids. *Front Plant Sci*, 5: 432.
- Krupinska, K., Dähnhardt, D., Fischer-Kilbienski, I., Kucharewicz, W., Scharrenberger, C., Trösch, M. & Buck, F. (2014b). Identification of WHIRLY1 as a factor binding to the promoter of the stress- and senescence-associated gene HvS40. *J Plant Growth Regul*, 33: 91–105.
- Kuroiwa, T., Suzuki, T., Ogawa, K. & Kawano, S. (1981). The chloroplast nucleus: distribution, number, size, and shape, and a model for the multiplication of the chloroplast genome during chloroplast development. *Plant Cell Physiol*, 22: 381–396.
- Kuroiwa, T. (1991). The replication, differentiation, and inheritance of plastids with emphasis on the concept of organelle nuclei. *Int Rev Cytol*, 128: 1–62.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680–685.
- Larkin, R.M. & Ruckle, M.E. (2008). Integration of light and plastid signals. *Curr Opin Plant Biol*, 11: 593–599.
- Li, G. & Reinberg, D. (2011). Chromatin higher-order structures and gene regulation. *Curr Opin Genet Dev*, 21: 175–186.
- Linder, H.P. & Rudall, P.J. (2005). Evolutionary history of poales. *Annu Rev Ecol Evol S*, 36: 107–124.
- Liu, J.W. & Rose, R.J. (1992). The spinach chloroplast chromosome is bound to the thylakoid membrane in the region of the inverted repeat. *Biochem Biophys Res Commun*, 184: 993–1000.
- Liu, J.H., Wang, W., Wu, H., Gong, X. & Moriguchi, T. (2015). Polyamines function in stress tolerance: from synthesis to regulation. *Front Plant Sci*, 6: 827.
- Livak, K.J. & Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods*, 25: 402–408.
- Lorand, L. & Graham, R.M. (2003). Transglutaminases: crosslinking enzymes with pleiotropic functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4: 140–156.

- Luijsterburg, M.S., Noom, M.C., Wuite, G.J.L. & Dame, R.T. (2006). The architectural role of nucleoid-associated proteins in the organization of bacterial chromatin: a molecular perspective. *J Struct Biol*, 156: 262–272.
- Luijsterburg, M.S., White, M.F., van Driel, R. & Dame, R.T. (2008). The major architects of chromatin: architectural proteins in bacteria, archaea and eukaryotes. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 43: 393–418.
- Macvanin, M. & Adhya, S. (2012). Architectural organization in *E. coli* nucleoid. *Biochim Biophys Acta*, 1819: 830–835.
- Majeran, W., Friso, G., Asakura, Y., Qu, X., Huang, M., Ponnala, L., Watkins, K.P., Barkan, A. & van Wijk, K.J. (2012). Nucleoid-enriched proteomes in developing plastids and chloroplasts from maize leaves: a new conceptual framework for nucleoid functions. *Plant Physiol*, 158: 156–189.
- Martin, W. & Herrmann, R.G. (1998). Gene transfer from organelles to the nucleus: how much, what happens, and why? *Plant Physiol*, 118: 9–17.
- Martin, W., Rujan, T., Richly, E., Hansen, A., Cornelsen, S., Lins, T., Leister, D., Stoebe, B., Hasegawa, M. & Penny, D. (2002). Evolutionary analysis of Arabidopsis, cyanobacterial, and chloroplast genomes reveals plastid phylogeny and thousands of cyanobacterial genes in the nucleus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99: 12246–12251.
- Maréchal, A., Parent, J.S., Sabar, M., Véronneau-Lafortune, F., Abou-Rached, C. & Brisson, N. (2008). Overexpression of mtDNA-associated AtWhy2 compromises mitochondrial function. *BMC Plant Biol*, 8: 42.
- Maréchal, A., Parent, J.S., Véronneau-Lafortune, F., Joyeux, A., Lang, B.F. & Brisson, N. (2009). Whirly proteins maintain plastid genome stability in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106: 14693–14698.
- Mateo, A., Funck, D., Mühlenbock, P., Kular, B., Mullineaux, P.M. & Karpinski, S. (2006). Controlled levels of salicylic acid are required for optimal photosynthesis and redox homeostasis. *J Exp Bot*, 57: 1795–1807.
- Melonek, J., Mulisch, M., Schmitz-Linneweber, C., Grabowski, E., Hensel, G. & Krupinska, K. (2010). Whirly1 in chloroplasts associates with intron containing RNAs and rarely co-localizes with nucleoids. *Planta*, 232: 471–481.
- Melonek, J., Matros, A., Trösch, M., Mock, H.P. & Krupinska, K. (2012). The core of chloroplast nucleoids contains architectural SWIB domain proteins. *Plant Cell*, 24: 3060–3073.
- Melonek, J., Oetke, S. & Krupinska, K. (2016). Multifunctionality of plastid nucleoids as revealed by proteome analyses. *Biochim Biophys Acta*, 1864: 1016-1038.
- Michael, A.J. (2016). Polyamines in eukaryotes, bacteria, and archaea. *J Biol Chem*, 291: 14896–14903.

- Miyamura, S., Nagata, T. & Kuroiwa, T. (1986). Quantitative fluorescence microscopy on dynamic changes of plastid nucleoids during wheat development. *Protoplasma*, 133: 66–72.
- Moriyama, T., Terasawa, K. & Sato, N. (2011). Conservation of POPs, the plant organellar DNA polymerases, in eukaryotes. *Protist*, 162: 177–187.
- Mou, Z., Fan, W. & Dong, X. (2003). Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell*, 113: 935–944.
- Nemoto, Y., Kawana, S., Nagata, T. & Kuroiwa, T. (1991). Studies on plastid-nuclei (nucleoids) in *Nicotiana tabacum* L. IV. Association of chloroplast-DNA with proteins at several specific sites in isolated chloroplast-nuclei. *Plant Cell Physiol*, 32: 131–141.
- Nielsen, B.L., Cupp, J.D. & Brammer, J. (2010). Mechanisms for maintenance, replication, and repair of the chloroplast genome in plants. *J Exp Bot*, 61: 2535–2537.
- Niyogi, K.K. (2000). Safety valves for photosynthesis. *Curr Opin Plant Biol*, 3, 455–460.
- Noom, M.C., Navarre, W.W., Oshima, T., Wuite, G.J.L. & Dame, R.T. (2007). H-NS promotes looped domain formation in the bacterial chromosome. *Curr Biol*, 17: R913–4.
- Nott, A., Jung, H.S., Koussevitzky, S. & Chory, J. (2006). Plastid-to-nucleus retrograde signaling. *Annu Rev Plant Biol*, 57: 739–759.
- Oberto, J., Nabti, S., Jooste, V., Mignot, H. & Rouviere-Yaniv, J. (2009). The HU regulon is composed of genes responding to anaerobiosis, acid stress, high osmolarity and SOS induction. *PLoS ONE*, 4: e4367.
- Oelmüller, R. & Mohr, H. (1986). Photooxidative destruction of chloroplasts and its consequences for expression of nuclear genes. *Planta*, 167: 106–113.
- Oetke, S. (2011). Plastidäre und mitochondriale SWIB-Domänenproteine der Gerste. Masterarbeit, Universität Kiel.
- Oldenburg, D.J. & Bendich, A.J. (2004). Most chloroplast DNA of maize seedlings in linear molecules with defined ends and branched forms. *J Mol Biol*, 335: 953–970.
- Olinares, P.D.B., Kim, J. & van Wijk, K.J. (2010). The Clp protease system; a central component of the chloroplast protease network. *Biochim Biophys Acta*, 1807: 999–1011.
- Olszówka, D., Maksymiec, W., Krupa, Z. & Krawczyk, S. (2003). Spectral analysis of pigment photobleaching in photosynthetic antenna complex LHCIIb. *J Photochem and Photobiol B: Biol*, 70: 21–30.
- Ono, Y., Sakai, A., Takechi, K., Takio, S., Takusagawa, M. & Takano, H. (2007). NtPoll-like1 and NtPoll-like2, bacterial DNA polymerase I homologs isolated from BY-2 cultured tobacco cells, encode DNA polymerases engaged in DNA replication in both plastids and mitochondria. *Plant Cell Physiol*, 48: 1679–1692.
- Parent, J.S., Lepage, E. & Brisson, N. (2011). Divergent roles for the two Poll-like organelle DNA polymerases of *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 156: 254–262.

- Pasini, A., Calderera, C.M. & Giordano, E. (2014). Chromatin remodeling by polyamines and polyamine analogs. *Amino Acids*, 46: 595–603.
- Pavan, G.M., Danani, A., Pricl, S. & Smith, D.K. (2009). Modeling the multivalent recognition between dendritic molecules and DNA: understanding how ligand “sacrifice” and screening can enhance binding. *J Am Chem Soc*, 131: 9686–9694.
- Pfalz, J., Liere, K., Kandlbinder, A., Dietz, K.J. & 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.
- Pfalz, J., Holtzegel, U., Barkan, A., Weisheit, W., Mittag, M. & Pfannschmidt, T. (2015). ZmpTAC12 binds single-stranded nucleic acids and is essential for accumulation of the plastid-encoded polymerase complex in maize. *New Phytol*, 206: 1024–1037.
- Pintó-Marijuan, M. & Munné-Bosch, S. (2014). Photo-oxidative stress markers as a measure of abiotic stress-induced leaf senescence: advantages and limitations. *J Exp Bot*, 65: 3845–3857.
- Poon, I.K.H. & Jans, D.A. (2005). Regulation of nuclear transport: central role in development and transformation? *Traffic*, 6: 173–186.
- Powikrowska, M., Oetke, S., Jensen, P.E. & Krupinska, K. (2014a). Dynamic composition, shaping and organization of plastid nucleoids. *Front Plant Sci*, 5: 424.
- Powikrowska, M., Khrouchtchova, A., Martens, H.J., Zygadlo-Nielsen, A., Melonek, J., Schulz, A., Krupinska, K., Rodermeil, S. & Jensen, P.E. (2014b). SVR4 (suppressor of variegation 4) and SVR4-like: two proteins with a role in proper organization of the chloroplast genetic machinery. *Physiol Plant*, 150: 477–492.
- Preuten, T., Cincu, E., Fuchs, J., Zoschke, R., Liere, K. & Börner, T. (2010). Fewer genes than organelles: extremely low and variable gene copy numbers in mitochondria of somatic plant cells. *Plant J*, 64: 948–959.
- Prikryl, J., Watkins, K.P., Friso, G., van Wijk, K.J. & Barkan, A. (2008). A member of the Whirly family is a multifunctional RNA- and DNA-binding protein that is essential for chloroplast biogenesis. *Nucleic Acids Res*, 36: 5152–5165.
- Pyke, K.A. (1999). Plastid division and development. *Plant Cell*, 11: 549–556.
- Pyke, K.A. & Leech, R.M. (1994). A genetic analysis of chloroplast division and expansion in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*, 104: 201–207.
- Qiao, J., Ma, C., Wimmelbacher, M., Börnke, F. & Luo, M. (2011). Two novel proteins, MRL7 and its paralog MRL7-L, have essential but functionally distinct roles in chloroplast development and are involved in plastid gene expression regulation in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol*, 52: 1017–1030.
- Race, H.L., Herrmann, R.G. & Martin, W. (1999). Why have organelles retained genomes? *Trends Genet*, 15: 364–370.

- Ragkousi, K. & Setlow, P. (2004). Transglutaminase-mediated cross-linking of GerQ in the coats of *Bacillus subtilis* spores. *J Bacteriol*, 186: 5567–5575.
- Ram, E.V.S.R., Naik, R., Ganguli, M. & Habib, S. (2008). DNA organization by the apicoplast-targeted bacterial histone-like protein of *Plasmodium falciparum*. *Nucleic Acids Res*, 36: 5061–5073.
- Rice, P.A., Yang, S., Mizuuchi, K. & Nash, H.A. (1996). Crystal structure of an IHF-DNA complex: a protein-induced DNA U-turn. *Cell*, 87: 1295–1306.
- Rimsky, S. & Travers, A. (2011). Pervasive regulation of nucleoid structure and function by nucleoid-associated proteins. *Curr Opin Microbiol*, 14: 136–141.
- Robertson, D. & Laetsch, W.M. (1974). Structure and function of developing barley plastids. *Plant Physiol*, 54: 148–159.
- Rochon, A., Boyle, P., Wignes, T., Fobert, P.R. & Després, C. (2006). The coactivator function of Arabidopsis NPR1 requires the core of its BTB/POZ domain and the oxidation of C-terminal cysteines. *Plant Cell*, 18: 3670–3685.
- Ruckle, M.E., DeMarco, S.M. & Larkin, R.M. (2007). Plastid signals remodel light signaling networks and are essential for efficient chloroplast biogenesis in Arabidopsis. *Plant Cell*, 19: 3944–3960.
- Sakai, A., Takano, H. & Kuroiwa, T. (2004). Organelle nuclei in higher plants: structure, composition, function, and evolution. *Int Rev Cytol*, 238: 59–118.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning. A laboratory manual*. Second Edition. New York: Cold Spring Harbor Press.
- Sarkar, T., Vitoc, I., Mukerji, I. & Hud, N.V. (2007). Bacterial protein HU dictates the morphology of DNA condensates produced by crowding agents and polyamines. *Nucleic Acids Res*, 35: 951–961.
- Sarkar, T., Petrov, A.S., Vitko, J.R., Santai, C.T., Harvey, S.C., Mukerji, I. & Hud, N.V. (2009). Integration host factor (IHF) dictates the structure of polyamine-DNA condensates: implications for the role of IHF in the compaction of bacterial chromatin. *Biochemistry*, 48: 667–675.
- Saski, C., Lee, S.B., Fjellheim, S., Guda, C., Jansen, R.K., Luo, H., Tomkins, J., Rognli, O.A., Daniell, H. & Clarke, J.L. (2007). Complete chloroplast genome sequences of *Hordeum vulgare*, *Sorghum bicolor* and *Agrostis stolonifera*, and comparative analyses with other grass genomes. *Theor Appl Genet*, 115: 571–590.
- Sato, N., Albrieux, C., Joyard, J., Douce, R. & Kuroiwa, T. (1993). Detection and characterization of a plastid envelope DNA-binding protein which may anchor plastid nucleoids. *EMBO J*, 12: 555–561.

- Sato, N., Misumi, O., Shinada, Y., Sasaki, M. & Yoine, M. (1997). Dynamics of localization and protein composition of plastid nucleoids in light-grown pea seedlings. *Protoplasma*, 200: 163–173.
- Sato, N., Ohshima, K., Watanabe, A., Ohta, N., Nishiyama, Y., Joyard, J. & Douce, R. (1998). Molecular characterization of the PEND protein, a novel bZIP protein present in the envelope membrane that is the site of nucleoid replication in developing plastids. *Plant Cell*, 10: 859–872.
- Sato, N. & Ohta, N. (2001). DNA-binding specificity and dimerization of the DNA-binding domain of the PEND protein in the chloroplast envelope membrane. *Nucleic Acids Res*, 29: 2244–2250.
- Sato, N., Nakayama, M. & Hase, T. (2001). The 70-kDa major DNA-compacting protein of the chloroplast nucleoid is sulfite reductase. *FEBS Lett*, 487: 347–350.
- Sato, N., Terasawa, K., Miyajima, K. & Kabeya, Y. (2003). Organization, developmental dynamics, and evolution of plastid nucleoids. *Int Rev Cytol*, 232: 217–262.
- Sato, N., Sekine, K., Kabeya, Y., Ehira, S., Onuma, M. & Ohta, N. (2004). Discontinuous evolution of plastid genomic machinery: radical replacement of major DNA-binding proteins. *Endocytobiosis Cell Res*, 15: 286–293.
- Scandalios, J.G. (1993). Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiol*, 101: 7–12.
- Schimper, A. (1883). Über die Entwicklung der Chlorophyllkörner und Farbkörper. *Botanische Zeitung*, 41: 105–112, 121–131, 137–146, 153–162.
- Schnetz, K., Toloczyki, C. & Rak, B. (1987). Beta-glucoside (bgl) operon of *Escherichia coli* K-12: nucleotide sequence, genetic organization, and possible evolutionary relationship to regulatory components of two *Bacillus subtilis* genes. *J Bacteriol*, 169: 2579–2590.
- Schnetz, K. (1995). Silencing of *Escherichia coli* bgl promoter by flanking sequence elements. *EMBO J*, 14: 2545–2550.
- Sekine, K., Hase, T. & Sato, N. (2002). Reversible DNA compaction by sulfite reductase regulates transcriptional activity of chloroplast nucleoids. *J Biol Chem*, 277, 24399–24404.
- Sekine, K., Fujiwara, M., Nakayama, M., Takao, T., Hase, T. & Sato, N. (2007). DNA binding and partial nucleoid localization of the chloroplast stromal enzyme ferredoxin:sulfite reductase. *FEBS J*, 274: 2054–2069.
- Serafini-Fracassini, D. & Del Duca, S. (2008). Transglutaminases: widespread cross-linking enzymes in plants. *Ann Bot*, 102:145–152.
- Sitte, P. (1977). Chromoplasten – bunte Objekte der modernen Zellbiologie. *Biologie in unserer Zeit*, 7: 65–74.

- Sjögren, L.L.E., Tanabe, N., Lympieropoulos, P., Khan, N.Z., Rodermeil, S.R., Aronsson, H. & Clarke, A.K. (2014). Quantitative analysis of the chloroplast molecular chaperone ClpC/Hsp93 in *Arabidopsis* reveals new insights into its localization, interaction with the Clp proteolytic core, and functional importance. *J Biol Chem*, 289: 11318–11330.
- Sobieszczuk-Nowicka, E. & Legocka, J. (2014). Plastid-associated polyamines: their role in differentiation, structure, functioning, stress response and senescence. *Plant Biol*, 16: 297–305.
- Spassky, A., Rimsky, S., Garreau, H. & Buc, H. (1984). H1a, an *E. coli* DNA-binding protein which accumulates in stationary phase, strongly compacts DNA in vitro. *Nucleic Acids Res*, 12: 5321–5340.
- Spurio, R., Dürrenberger, M., Falconi, M., La Teana, A., Pon, C.L. & Gualerzi, C.O. (1992). Lethal overproduction of the *Escherichia coli* nucleoid protein H-NS: ultramicroscopic and molecular autopsy. *Mol Gen Genet*, 231: 201–211.
- Stegemann, S., Hartmann, S., Ruf, S. & Bock, R. (2003). High-frequency gene transfer from the chloroplast genome to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100: 8828–8833.
- Swinger, K.K., Lemberg, K.M., Zhang, Y. & Rice, P.A. (2003). Flexible DNA bending in HU-DNA cocrystal structures. *EMBO J*, 22: 3749–3760.
- Tanaka, H., Iguchi, N., Isotani, A., Kitamura, K., Toyama, Y., Matsuoka, Y., Onishi, M., Masai, K., Maekawa, M., Toshimori, K., Okabe, M. & Nishimune, Y. (2005). HANP1/H1T2, a novel histone H1-like protein involved in nuclear formation and sperm fertility. *Mol Cell Biol*, 25: 7107–7119.
- Tarasenko, V.I., Katyshev, A.I., Subota, I.Y. & Konstantinov, Y.M. (2012). Recombinant *Arabidopsis* WHY2 protein binds unspecifically to single-stranded DNA and is phosphorylated by mitochondrial protein kinases. *Plant Omics*, 5: 372–375.
- Taylor, W.C. (1989). Regulatory interactions between nuclear and plastid genomes. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 40: 211–233.
- Terasawa, K. & Sato, N. (2005). Occurrence and characterization of PEND proteins in angiosperms. *J Plant Res*, 118: 111–119.
- Udy, D.B., Belcher, S., Williams-Carrier, R., Gualberto, J.M. & Barkan, A. (2012). Effects of reduced chloroplast gene copy number on chloroplast gene expression in maize. *Plant Physiol*, 160: 1420–1431.
- van Loon, L.C. & van Strien, E.A. (1999). The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol Mol Plant Path*, 55: 85–97.
- Venkatesh, G.R., Koungni, F.C.K., Paukner, A., Stratmann, T., Blissenbach, B. & Schnetz, K. (2010). BglJ-RcsB heterodimers relieve repression of the *Escherichia coli* bgl operon by H-NS. *J Bacteriol*, 192: 6456–6464.

- Vermel, M., Guermann, B., Delage, L., Grienenberger, J.M., Maréchal-Drouard, L. & Gualberto, J.M. (2002). A family of RRM-type RNA-binding proteins specific to plant mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99: 5866–5871.
- Viles, J.H., Cohen, F.E., Prusiner, S.B., Goodin, D.B., Wright, P.E. & Dyson, H.J. (1999). Copper binding to the prion protein: structural implications of four identical cooperative binding sites. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96: 2042–2047.
- Wanner, G. (2004). *Mikroskopisch-Botanisches Praktikum*. 1. Auflage. Stuttgart: Georg Thieme, 72.
- Weber, P., Fulgosi, H., Piven, I., Müller, L., Krupinska, K., Duong, V.H., Herrmann, R.G. & Sokolenko, A. (2006). TCP34, a nuclear-encoded response regulator-like TPR protein of higher plant chloroplasts. *J Mol Biol*, 357: 535–549.
- Wiedemann, G., Hermsen, C., Melzer, M., Büttner-Mainik, A., Rennenberg, H., Reski, R. & Kopriva, S. (2010). Targeted knock-out of a gene encoding sulfite reductase in the moss *Physcomitrella patens* affects gametophytic and sporophytic development. *FEBS Lett*, 584: 2271–2278.
- Woodson, J.D. & Chory, J. (2008). Coordination of gene expression between organellar and nuclear genomes. *Nat Rev Genet*, 9: 383–395.
- Wycliffe, P., Sitbon, F., Wernersson, J., Ezcurra, I., Ellerström, M. & Rask, L. (2005). Continuous expression in tobacco leaves of a *Brassica napus* PEND homologue blocks differentiation of plastids and development of palisade cells. *Plant J*, 44: 1–15.
- Xiong, J.Y., Lai, C.X., Qu, Z., Yang, X.Y., Qin, X.H. & Liu, G.Q. (2009). Recruitment of AtWHY1 and AtWHY3 by a distal element upstream of the kinesin gene AtKP1 to mediate transcriptional repression. *Plant Mol Biol*, 71: 437–449.
- Yagi, Y. & Shiina, T. (2014). Recent advances in the study of chloroplast gene expression and its evolution. *Front Plant Sci*, 5: 61.
- Yan, W., Ma, L., Burns, K.H. & Matzuk, M.M. (2003). HILS1 is a spermatid-specific linker histone H1-like protein implicated in chromatin remodeling during mammalian spermiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100: 10546–10551.
- Yoo, H.H., Kwon, C., Lee, M.M. & Chung, I.K. (2007). Single-stranded DNA binding factor AtWHY1 modulates telomere length homeostasis in Arabidopsis. *Plant J*, 49: 442–451.
- Yurina, N.P., Belkina, G.G., Karapetyan, N.V. & Odintsova, M.S. (1995). Nucleoids of pea chloroplasts: microscopic and chemical characterization. Occurrence of histone-like proteins. *Biochem Mol Biol Int*, 36: 145–154.

7 Anhang

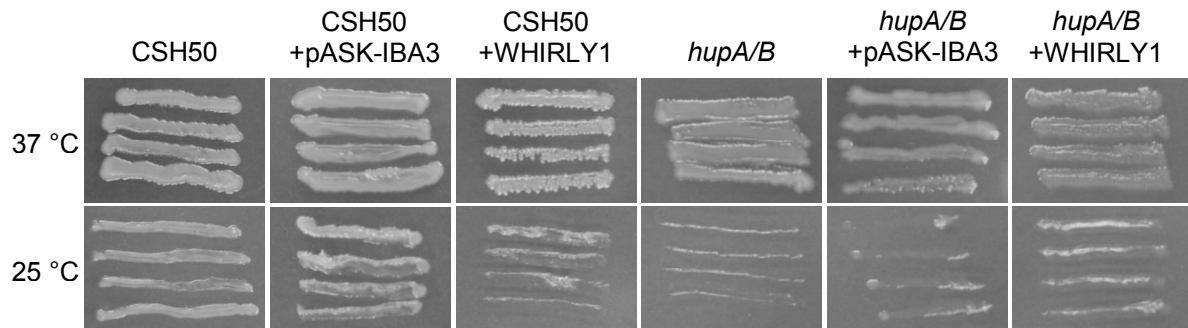


Abb. 55: Komplementationsversuch von der *hupA/B*-Mutante mit dem WHIRLY1-Protein der Gerste.

Die Komplementation erfolgte auf LB-Medium mit 0,2 µM Anhydrotetracyclin bei 37 °C bzw. 25 °C über Nacht. Es wurde der Vektor pASK-IBA3/HvWHY1 (+WHIRLY1) bzw. als Negativkontrolle der Leervektor pASK-IBA3 (+pASK-IBA3) verwendet. CSH50 = Wildtyp *E. coli* Stamm, *hupA/B* = Mutante für das HU α - und HU β -Protein.

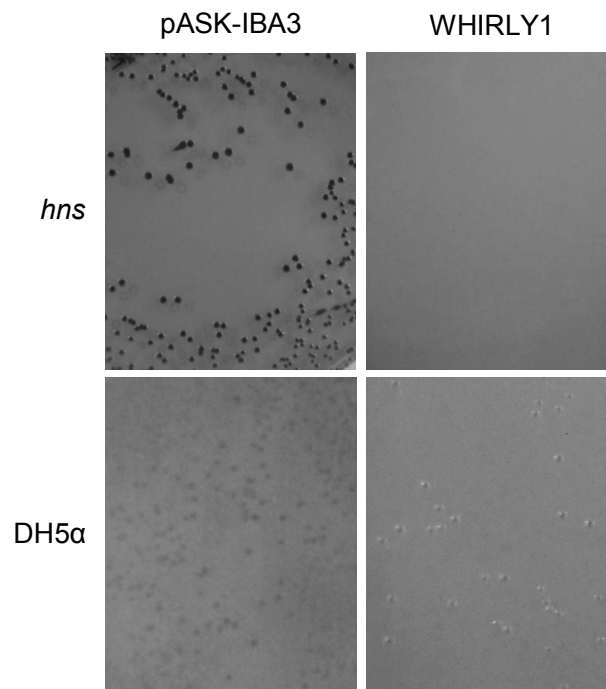


Abb. 56: Komplementationsversuch von der *hns*-Mutante mit dem WHIRLY1-Protein der Gerste.

Die Komplementation erfolgte auf MacConkey-Medium mit 0,5% Salicin und 0,2 µM Anhydrotetracyclin bei 37 °C über Nacht. Es wurde der Vektor pASK-IBA3/HvWHY1 (WHIRLY1) bzw. als Negativkontrolle der Leervektor pASK-IBA3 (pASK-IBA3) verwendet. DH5 α = Wildtyp *E. coli* Stamm, *hns* = Mutante für das H-NS-Protein.

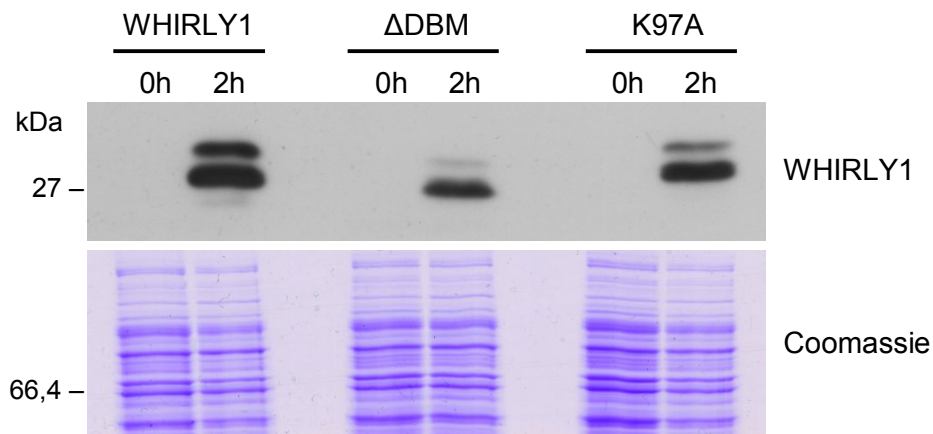


Abb. 57: Immunologischer Nachweis des rekombinanten HvWHIRLY1 Δ DBM- und HvWHIRLY1K97A-Proteins.

Zum Zeitpunkt der Induktion (0h) und zwei Stunden nach der Induktion (2h) wurde jeweils 1 ml Flüssigkultur abgenommen. In Abhängigkeit von der gemessenen Zelldichte bei OD_{600} wurde die aus 1 ml Flüssigkultur pelletierten Zellen in 1 x PSB aufgenommen und auf das SDS-PA-Gel aufgetragen. Zur Detektion wurde der Antikörper gegen HvWHIRLY1 eingesetzt. Als Beladungskontrolle wurde der obere Teil des SDS-PA-Gels mit Coomassie-Brilliantblau gefärbt, während der untere Teil für den Western Blot verwendet wurde. WHIRLY1 = Bakterienlysat der Zellen, in denen die WHIRLY1-Sequenz der Gerste überexprimiert wurde, Δ DBM = Lysate der Zellen, die HvWHIRLY1 Δ DBM exprimierten, K97A = Bakterienlysat der Zellen, in denen HvWHIRLY1K97A exprimiert wurde.

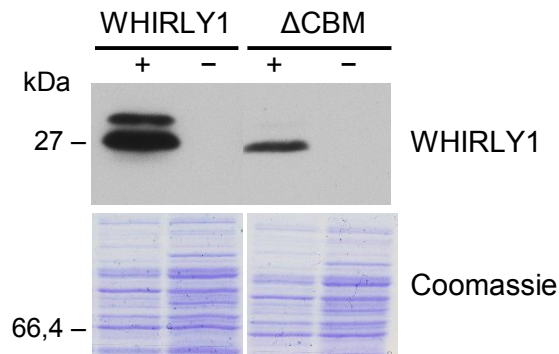


Abb. 58: Immunologischer Nachweis des rekombinanten HvWHIRLY1 Δ CBM-Proteins.

Zwei Stunden nach der Induktion (+) bzw. ohne Induktion (-) wurde jeweils 1 ml Flüssigkultur abgenommen. In Abhängigkeit von der gemessenen Zelldichte bei OD_{600} wurde die aus 1 ml Flüssigkultur pelletierten Zellen in 1 x PSB aufgenommen und auf das SDS-PA-Gel aufgetragen. Zur Detektion wurde der Antikörper gegen HvWHIRLY1 eingesetzt. Als Beladungskontrolle wurde der obere Teil des SDS-PA-Gels mit Coomassie-Brilliantblau gefärbt, während der untere Teil für den Western Blot verwendet wurde. WHIRLY1 = Bakterienlysat der Zellen, in denen die Expression der WHIRLY1-Sequenz der Gerste induziert (+) bzw. nicht induziert (-) wurde, Δ CBM = Lysate der Zellen, in denen die Expression von HvWHIRLY1 Δ CBM induziert (+) bzw. nicht induziert (-) wurde.

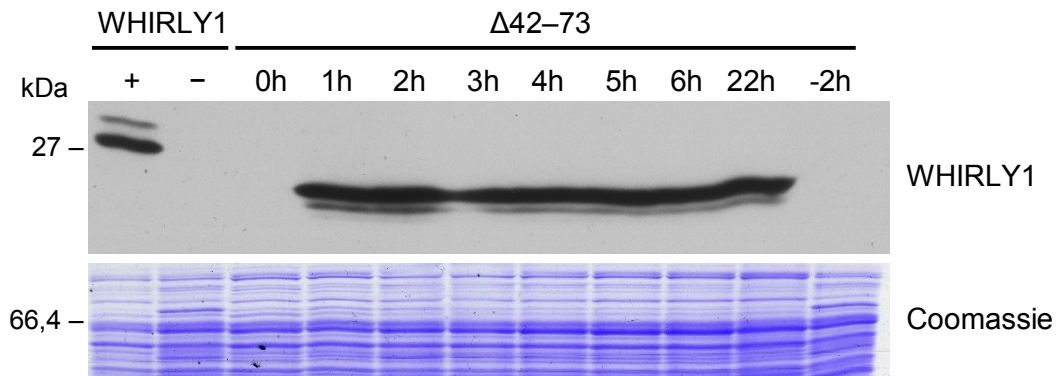


Abb. 65: Immunologischer Nachweis des rekombinanten WHIRLY1 Δ 42-73-Proteins.

Zum Zeitpunkt der Induktion (0h) sowie ein bis 22 Stunden nach der Induktion (1h-22h) bzw. zwei Stunden ohne Induktion (-2h) wurde jeweils 1 ml Flüssigkultur abgenommen. In Abhängigkeit von der gemessenen Zelldichte bei OD_{600} wurde die aus 1 ml Flüssigkultur pelletierten Zellen in 1 x PSB aufgenommen und auf das SDS-PA-Gel aufgetragen. Zur Detektion wurde der Antikörper gegen HvWHIRLY1 eingesetzt. Als Beladungskontrolle wurde der obere Teil des SDS-PA-Gels mit Coomassie-Brilliantblau gefärbt, während der untere Teil für den Western Blot verwendet wurde. WHIRLY1 = Bakterienlysate von Zellen zwei Stunden nach Induktion der Expression (+) bzw. ohne Induktion (-) der WHIRLY1-Sequenz der Gerste, Δ 42-73 = Lysate von Zellen, die HvWHIRLY1 Δ 42-73 überexprimierten.

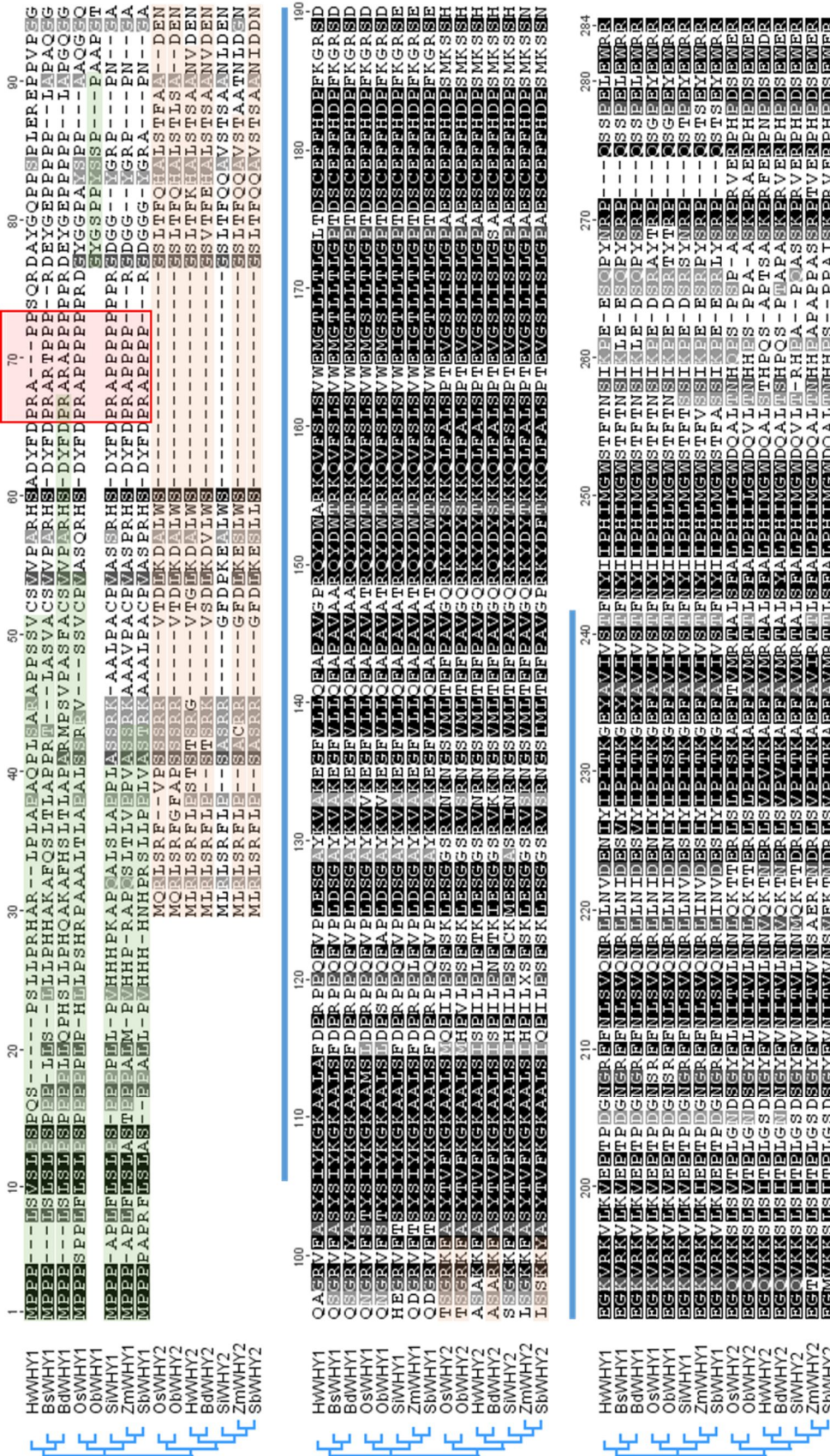


Abb. 66: Vergleich der Aminosäuresequenzen von monokotylen WHIRLY1- und WHIRLY2-Proteinen.

Der Sequenzvergleich mit integriertem Stammbaum wurde mit Geneious 8.1.6 (ClustalW) erstellt. Konservierte Aminosäuren sind schwarz (100 % Ähnlichkeit), dunkelgrau (80–100 % Ähnlichkeit) bzw. hellgrau (60–80 % Ähnlichkeit) unterlegt. Die folgenden Proteinssequenzen wurden für den Vergleich verwendet (Name, Organismus, GenBank Accessionnummer): HvWHY1, *Hordeum vulgare*, BAJ96655; BsWHY1, *Brachypodium sylvaticum*, ABL85062; BdWHY1, *Brachypodium distachyon*, XP_003557198; OsWHY1, *Oryza sativa*, BAD68418; ObWHY1, *Oryza brachyantha*, XP_006656631; SiWHY1, *Setaria italica*, XP_004964537; ZmWHY1, *Zea mays*, NP_0011233589; SbWHY1, *Sorghum bicolor*, XP_002436467; OsWHY2, *Oryza sativa*, NP_001045956; ObWHY2, *Oryza brachyantha*, XP_006664903; HvWHY2, *Hordeum vulgare*, BF627441.2, proteinkodierender offene Leserahmen +3 von Nukleotid 39–740; BdWHY2, *Brachypodium distachyon*, XP_003574931; SiWHY2, *Setaria italica*, XP_004951836; ZmWHY2, *Zea mays*, NP_001152589; SbWHY2, *Sorghum bicolor*, XP_002453336. Grün unterlegt = mit TargetP vorhergesagte plastidäre Transitssequenz, orange unterlegt = mit TargetP vorhergesagte mitochondriale Präsequenz, blau = WHIRLY-Domäne, rot = innerhalb der monokotylen WHIRLY1-Proteine konserviertes PRAPP-Motiv.

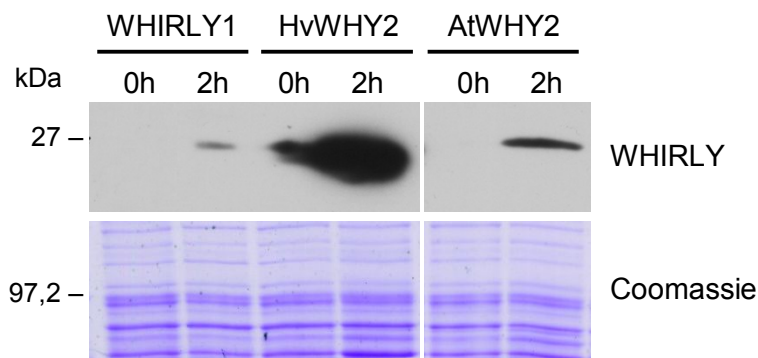


Abb. 67: Immunologischer Nachweis des rekombinanten WHIRLY2-Proteins von Gerste und Arabidopsis. Zum Zeitpunkt der Induktion (0h) und zwei Stunden nach der Induktion (2h) wurde jeweils 1 ml Flüssigkultur abgenommen. In Abhängigkeit von der gemessenen Zelldichte bei OD_{600} wurde die aus 1 ml Flüssigkultur pelletierten Zellen in 1 x PSB aufgenommen und auf das SDS-PA-Gel aufgetragen. Zur Detektion wurde der Antikörper gegen HvWHIRLY1 eingesetzt. Als Beladungskontrolle wurde der obere Teil des SDS-PA-Gels mit Coomassie-Brilliantblau gefärbt, während der untere Teil für den Western Blot verwendet wurde. WHIRLY1 = Bakterienlysat der Zellen, die die *WHIRLY1*-Sequenz der Gerste überexprimierten, HvWHY2 = Lysate der Zellen, die die *WHIRLY2*-Sequenz der Gerste überexprimierten, AtWHY2 = Lysate der Zellen, die die *WHIRLY2*-Sequenz von Arabidopsis überexprimierten.

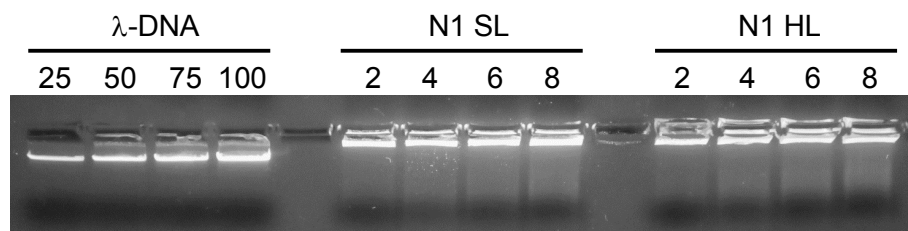


Abb. 68: Elektrophoretische Auftrennung der DNA aus plastidären Nukleoiden.

Für die Auftrennung wurde ein 0,75 %iges Agarosegel verwendet. Es wurden 2, 4, 6 bzw. 8 μ l der Nukleoidfraktion 1 (N1) aus dem Schwachlicht (SL) und dem Hochlicht (HL) aufgetragen. Zur Quantifizierung der DNA dienten 25, 50, 75 bzw. 100 ng Lambda-DNA (λ DNA). Gleiche Volumina der Nukleoidfraktionen 1 aus dem Schwach- und Hochlicht entsprechen der gleichen Menge an ptDNA.

Tab. 12: Auflistung aller in die *HvWHIRLY1*-Sequenz eingeführten Mutationen bzw. Deletionen.

Die Nummerierung der Aminosäuren bezieht sich auf die Position der Aminosäure im Vorstufenprotein. Die Mutationen bzw. Deletionen sind entsprechend der Reihenfolge im Ergebnisteil 3.2 genannt. Die jeweils mutierten bzw. deletierten Aminosäuren sind fett markiert. Die Positionen der mutierten bzw. deletierten Aminosäuren im reifen *HvWHIRLY1*-Protein sind, wenn nicht im Namen der Mutation wiederzufinden, in Klammern angegeben.

Mutation/Deletion	Effekt auf das Zellwachstum und die Nukleotide in <i>E. coli</i>	Sequenz
Mutationen/Deletionen in konservierten Motiven		
Δ DBM (Δ 95-100)	ja	KGKAAL
K97A	ja	KGAAAL
Δ CBM (Δ 234-239)	ja	PHIMGW
Δ PAD (Δ 246-267)	ja	IKPEESQPYNRPQSSPELEWRR
Mutationen/Deletionen am N-Terminus		
Δ 42-73	nein	MCSVVPARHSADYFDPRAPPSQRDAYGQPPSPL
Δ 42-60	nein	MCSVVPARHSADYFDPRAPP
Δ 61-73	ja	MCSVVPARHSADYFDPRAPPS QRDAYGQPPSP
Δ 48-58	nein	MCSVVPARHSADYFDPRAPP
Δ 48-60	nein	MCSVVPARHSADYFDPRAPP
Δ PRAPP (Δ 56-60)	nein	MCSVVPARHSADYFDPRAPP
P56/59/60A	nein	MCSVVPARHSADYFDPRAPP
P56A	ja	MCSVVPARHSADYFDPRAPP
R57A	nein	MCSVVPARHSADYFDPRAPP

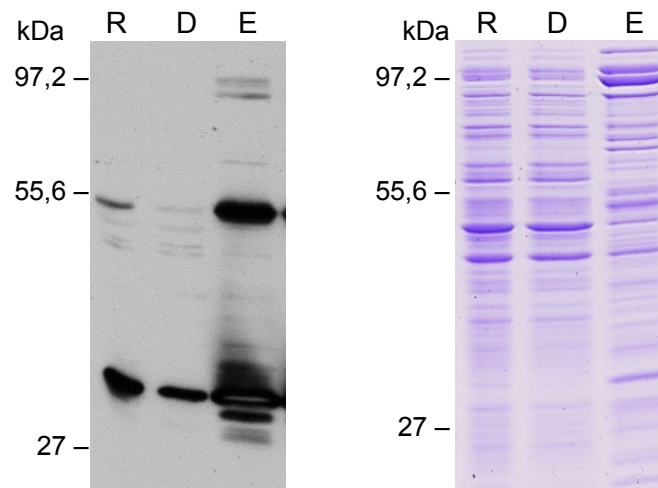


Abb. 69: Immunologischer Nachweis des rekombinanten WHIRLY1-Proteins der Gerste mit N-terminalem His-Tag nach Ni-NTA-Aufreinigung.

Es wurden vergleichbare Mengen des Rohextraktes (R) nach Aufschluss der Zellen mittels Ultraschall (siehe 2.4.2) sowie des Durchlaufs (D) und des Eluats (E) der nativen Proteinaufreinigung (siehe 2.4.3) auf einem 14 %igen SDS-PA-Gel aufgetragen. Zur Detektion wurde der Antikörper gegen HvWHIRLY1 eingesetzt (links). Ein vergleichbares SDS-PA-Gel wurde mit Coomassie-Brilliantblau gefärbt (rechts).

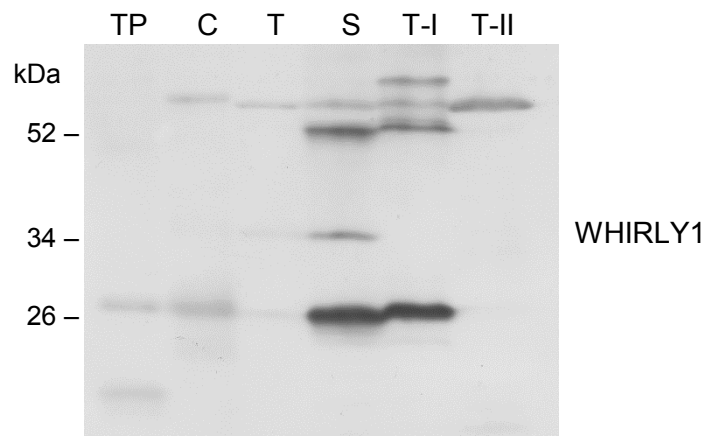


Abb. 70: Immunologischer Nachweis des HvWHIRLY1-Proteins in plastidären Subfraktionen der Gerste (J. Melonek unveröffentlicht).

Zur Detektion wurde der Antikörper gegen HvWHIRLY1 verwendet. TP = Gesamtproteinextrakt, C = Chloroplasten, T = Thylakoidmembranen, S = Stroma, T-I = TAC-I-Fraktion, T-II = TAC-II-Fraktion.

8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all den Menschen bedanken, die mir bei der experimentellen Arbeit und der schriftlichen Abfassung hilfsbereit zur Seite gestanden und mich in dieser Zeit unterstützt haben.

Als erstes danke ich Frau Prof. Dr. Karin Krupinska für die Bereitstellung des interessanten Themas und die Möglichkeit in ihrer Arbeitsgruppe zu promovieren. Vor allem ihre rege Diskussionsbereitschaft, ihr Wissen und ihre Ideen haben diese Arbeit immer wieder vorangetrieben. Ich habe mich all die Jahre und auch während der Anfertigung dieser Arbeit sehr gut betreut und aufgehoben gefühlt.

Für die Erstellung der WHIRLY1-RNAi-Linien möchte ich mich bei Herrn Dr. Götz Hensel und Herrn Dr. Jochen Kumlehn vom IPK in Gatersleben bedanken.

Ich danke ganz herzlich Susanne, Anke und Uli, die mir jederzeit im Labor zu technischen Fragen mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben. Anke gilt mein besonderer Dank für die Unterstützung mit den qRT-PCRs.

Frau Dr. Christine Desel möchte ich für ihre Hilfe am CLSM und ihre lieben und wertvollen Ratschläge bedanken. Julien Hollmann danke ich für die Erstellung des WHIRLY-Stammbaums und für seine Hilfsbereitschaft nicht nur bei bioinformatischen Angelegenheiten.

Ich danke allen ehemaligen und jetzigen Gruppenmitgliedern der AG Krupinska: Andrea A., Mirl, Julien, Susann, Andrea C., Wera, Luca, Uwe, Rena und Joanna. Vielen Dank für eure vielseitige Unterstützung, die angenehme Arbeitsatmosphäre und die schöne Zeit. Außerdem möchte ich mich bei den Mitgliedern der AG Bilger und der AG Schulz bedanken.

Zu Dank verpflichtet bin ich auch Herrn Prof. Dr. Axel J. Scheidig für sein Interesse und seine fachkundigen Ratschläge und Ideen.

Schließlich möchte ich mich bei den wichtigsten Menschen in meinem Leben bedanken: Mama, Papa und Roland. Vielen Dank für eure liebevolle Unterstützung und die gemeinsamen Stunden, die den Akku immer wieder aufgeladen haben.

9 Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Name	Svenja Oetke
Geburtsdatum	27. 02.1987
Geburtsort	Uelzen
Nationalität	deutsch
Familienstand	ledig

BERUFSERFAHRUNG/PROMOTION

seit 2012	Promotion an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel Betreuung durch Prof. Dr. Karin Krupinska
-----------	---

UNIVERSITÄRE AUSBILDUNG

2006-2011	Studium der Biologie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel Vertiefungsrichtungen: Genetik & Mikrobiologie, Zellbiologie
04/2012	Abschluss: Master of Science (Betreuung der Masterarbeit durch Prof. Dr. Karin Krupinska)
11/2009	Abschluss: Bachelor of Science (Betreuung der Bachelor- arbeit durch Prof. Dr. Manuela Dittmar)

SCHULISCHE AUSBILDUNG

1999-2006	Herzog-Ernst-Gymnasium, Uelzen
06/2006	Allgemeine Hochschulreife
1993-1999	Grund- und Orientierungsschule Hermann-Löns-Grundschule, Uelzen

10 Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit – abgesehen von der Beratung durch meine Betreuerin – nach Inhalt und Form meine Arbeit ist und unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft angefertigt wurde. Diese Arbeit wurde bis jetzt weder vollständig noch in Teilen einer anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt.

Teile der Arbeit sind in folgender Publikation enthalten:

Krupinska, K., Oetke, S., Desel, C., Mulisch, M., Schäfer, A., Hollmann, J., Kumlehn, J. & Hensel, G. (2014). WHIRLY1 is a major organizer of chloroplast nucleoids. *Front Plant Sci*, 5: 432.

Beiträge in Mitteilungsbänden von Tagungen

Oetke, S., Desel, C., Hollmann, J. & Krupinska, K. (2014). The WHIRLY1 protein – a mediator between chloroplast nucleoid organization and regulation of replication. XVI. Annual Meeting of the International Society of Endocytobiology – German Section (ISE-G), Herzogenhorn.

Oetke, S., Desel, C., Hollmann, J. & Krupinska, K. (2015). The WHIRLY1 protein mediates chloroplast nucleoid organization. 28. Tagung Molekularbiologie der Pflanzen, Dabringhausen.

Oetke, S., Mulisch, M., Hensel, G., Krieger-Liszkay, A., Boschian, L. & Krupinska, K. (2015). The level of the DNA/RNA-binding protein WHIRLY1 in chloroplasts determines the stress resistance of barley plants. Botanikertagung 2015, Freising.

Oetke, S., Hensel, G. & Krupinska, K. (2015). Chloroplast nucleoids are organized by the WHIRLY1 protein. Annual Conference of the German Genetics Society, Kiel.

Oetke, S., Desel, C., Hensel, G. & Krupinska, K. (2015). Compaction of chloroplast nucleoids is promoted by the DNA/RNA-binding protein WHIRLY1 and is impaired in chloroplasts developing in continuous high light. XVII. Annual Meeting of the International Society of Endocytobiology – German Section (ISE-G), Berlin.

Kiel, den

.....

Svenja Oetke