Oliver Drechsel: Untersuchungen zu Struktur und Expression des Plastidengenoms höherer Pflanzen Dieses Werk ist unter einem Creative Commons Lizenzvertrag lizenziert: Namensnennung - Keine kommerzielle Nutzung - Weitergabe unter gleichen Bedingungen 3.0 Deutschland Um die Bedingungen der Lizenz einzusehen, folgen Sie bitte dem Hyperlink:

http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/de/

Online veröffentlicht auf dem Publikationsserver der Universität Potsdam: http://opus.kobv.de/ubp/volltexte/2009/3105/ urn:nbn:de:kobv:517-opus-31056 [http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:kobv:517-opus-31056]

## Untersuchungen zu Struktur und Expression des Plastidengenoms höherer Pflanzen

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades "Doctor rerum naturalium" (Dr. rer. nat)

eingereicht an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Potsdam

> von Oliver Drechsel Potsdam, Dezember 2008

"Du kannst dein Leben nicht verlängern und du kannst es auch nicht verbreitern – aber du kannst es vertiefen!"

Gorch Fock

## Inhaltsverzeichnis

1	Einle	eitung 7
	1.1	Genexpression in <i>E. coli</i>
		1.1.1 Translations initiation in $E. coli$
		1.1.2 Nachweise der Bedeutung von SD-Sequenzen in <i>E. coli</i>
	1.2	Genexpression in Plastiden von <i>N. tabacum</i>
		1.2.1 Translationsinitiation in <i>N. tabacum</i> -Plastiden
	1.3	Zielstellung zur Untersuchung der Rolle von Shine-Dalgarno-Sequenzen in E. coli
		und Plastiden
	1.4	Untersuchungen zur Bastardbleichheit in <i>Pelargonium</i>
		1.4.1 Struktur- und Sequenzunterschiede plastidärer Genome
		1.4.2 Plastom-Genom-Inkompatibilität
	1.5	Zielstellung zur Untersuchung der Bastardbleichheit in Pelargonium zonale 25
2	Mate	erialien und Methoden 27
-	2.1	Abkürzungen 27
	$\frac{2}{2}$ 2	Lösungen 27
	2.2	Oligonukleotide 30
	2.0 2.4	Materialien 32
	2.5	Klonierung der SD-Sequenz-Konstrukte
	$\frac{2.5}{2.6}$	Constische Transformation 34
	2.0	2.6.1 Transformation von Tabakplastiden 34
		2.62 Transformation von <i>E coli</i> $35$
	27	Kulturbadingungan
	4.1	2.7.1 Washstumshodingungan für Tabak
		2.7.1 Wachstumsbedingungen für $E$ coli 2.7.2 Wachstumsbedingungen für $E$ coli
	28	Isolation von Proteinon und Nukleinsäuren
	2.0	2.8.1 Isolation von DNA 37
		$2.8.1  \text{Isolation von DNA}  \dots  \dots  \dots  \dots  \dots  \dots  \dots  \dots  \dots  $
		$2.8.2  \text{Isolation von Protein} \qquad \qquad$
	2.0	2.8.5 Isolation von Floten
	2.9	Desteinhestimmun m
	2.10	$\begin{array}{c} \text{Froteinbestimmung} \\ \text{2.10.1} \\ \text{DCA Nachmain} \\ \text{Mathematic} \\ \begin{array}{c} 40 \\ 10 \\ 10 \\ 10 \\ 10 \\ 10 \\ 10 \\ 10 \\$
		2.10.1 $DOA$ -Nachweis
	0.11	2.10.2 Froteinnachweis nach Dradiord (1970)
	2.11	2 11 1 Drotoin melalattaan baraga in Tria/Triain Calan
		2.11.1 Proteingeleiektrophorese in Tris/Tricin-Gelen
		2.11.2 Froteingeleiektrophorese in Tris/Giychi-Gelen
		$2.11.3  \text{Western Blot}  \dots  \dots  \dots  \dots  \dots  \dots  \dots  \dots  \dots  $
	0 10	2.11.4 Immundetektion von Proteinen
	2.12	Quantifizierung von RNA- und Proteingehalten
	2.13	Polysomenisolation
	2.14	Unioropiastenisolation
3	Erge	bnisse 46
	3.1	Klonierung von Shine-Dalgarno-Sequenz-Konstrukten
	3.2	Plastidentransformation von <i>N. tabacum</i>

Α	Anh	ang		124
J	∠usa	annnen	nassung	100
F	7	mmor	faceung	104
		4.2.5	Zukünftige Experimente zur Aufklärung der Mechanismen der Bastard-	102
		4.2.4	Anwendung des Dobzhansky-Muller-Modells auf Plastom-Genom-Inkompa-	109
		4.2.3	Mögliche Ursachen der Bastardbleichheit	98
		4.2.2	Unterschiede der Plastidengenome	97
		4.2.1	Gemeinsame Eigenschaften der drei untersuchten Plastidengenome	95
	4.2	Unters	Suchungen zur Bastardbleichheit in der Gattung <i>Pelargonium</i>	95
	4.0	TT -	Sequenzen in Plastiden	94
		4.1.8	Zukünftige Experimente zur detaillierten Untersuchung der Rolle von SD-	
		4.1.7	Anwendungsmöglichkeiten der gewonnenen Ergebnisse	93
		4.1.6	Mechanismus der Selektion von SD-Sequenzen in $E.\ coli$ und Plastiden	90
			Plastiden	90
		4.1.5	Nutzung aufeinanderfolgender Translationsinitiationsstellen in $E. \ coli$ und	
		4.1.4	Einfluss von kleinen ORFs auf die Translationsinitiation	89
		4.1.3	Einfluss von <i>cis</i> -Elementen auf die Translationsinitiation	87
		4.1.2	Rolle des Abstands der SD-Sequenzen zueinander auf die Translationsrate	86
		4.1.1	Einfluss der SD-Sequenz-Varianten auf die RNA-Akkumulation	85
	1.1	Plastie	den	84
4	4.1	Rolle	von Shine-Dalgarno-Sequenzen in der Translationsinitiation in $E$ coli und	04
Δ	Diek	ussion		Q <i>1</i>
		3.7.3	Vergleich von vier <i>Pelargonium</i> -Plastidengenomen	76
		3.7.2	Sequenz der Pelargonium-Plastidengenome	71
	-	3.7.1	Isolation von Chloroplasten und Plastiden-DNA	71
	3.7	Seque	nzierung von Plastidengenomen der Gattung <i>Pelargonium</i>	71
	3.6	Unters	suchung der Ribosomenbeladung des <i>afn</i> -Transkripts in <i>N. tabacum</i>	69
		0.0.0	der Translationseffizienz	67
		252	den in <i>IV. tabacum</i>	66
		3.5.2	Einfluss der SD-Sequenz-Varianten auf die Translationseffizienz in Plasti-	
		3.5.1	Untersuchung der Translationseffizienz in <i>E. coli</i>	64
		fizienz	in beiden untersuchten Systemen	64
	3.5	Zusan	nmenfassung der Transkriptions- und Translationsdaten zur Translationsef-	
	3.4	Einflu	ss der RNA-Faltung auf die Translationsinitiation	62
			schiedenen SD-Sequenz-Varianten	58
		3.3.4	GFP-Akkumulation in Plastiden von <i>N. tabacum</i> in Abhängigkeit von ver-	01
		01010	<i>N. tabacum</i>	57
		3.3.3	Einfluss der SD-Sequenz-Varianten auf die <i>afn</i> -Transkriptakkumulation in	იი
		J.J.Z	in E coli	52
		220	E. coll	52
		3.3.1	Einfluss der SD-Sequenz-Varianten auf die <i>gfp</i> -Transkriptakkumulation in	50
	3.3	Vergle	ch der Reportergenexpression in <i>E. coli</i> und Tabakplastiden	51

## Tabellenverzeichnis

1.1	SD-Sequenzen in 5'UTR in plastidärer mRNA	4
2.1	Verwendete Oligonukleotide	1
2.2	Zusammensetzung RM-Medium	4
2.3	Zusammensetzung RMOP-Medium	4
2.4	Kulturbedingungen für Tabak während der Sterilkultur	6
2.5	Kulturbedingungen für Tabak im Phytotron	6
2.6	Kulturbedingungen für Tabak im Glasgewächshaus	6
2.7	Zusammensetzung des Tris/Tricin-Gels	1
2.8	Zusammensetzung des Tris/Glycin-Gels	2
2.9	Kulturbedingungen für Pelargonium zonale im Glasgewächshaus 44	4
3.1	relative Expressionsstärke des $gfp$ in $E. coli$	4
3.2	relative GFP-Akkumulation der jeweiligen GFP-Varianten	<b>5</b>
3.3	relative Expressionsstärke des gfp in N. tabacum	9
3.4	relative GFP-Akkumulation der jeweiligen GFP-Varianten	1
3.5	freie Faltungsenthalpien der untersuchten Konstrukte	3
3.6	Translationsinitiationseffizienz in Abhängigkeit von der Anzahl der SD-Sequenzen	
	in $E. \ coli$	4
3.7	Translationsinitiationseffizienz in Abhängigkeit von der Anzahl der SD-Sequenzen	
	in Tabak	6
3.8	Kontamination der Chloroplasten DNA mit nukleärer DNA	3
3.9	Zusammenfassung der plastomkodierten Gene	4
3.10	Eigenschaften von vier <i>Pelargonium spec.</i> Plastomen	7
3.11	Zusammenstellung der Mutationen in den untersuchten Plastomen	2
3.12	Insertionen und Deletionen im Vergleich der drei Plastome	3
A.1	Zusammenstellung aller Basenaustausche	2
A.2	Codonhäufigkeiten in vier untersuchten Plastomen	<b>5</b>

# Abbildungsverzeichnis

1.1	Translationsinitiationsmechanismus in <i>E. coli</i>
1.2	Nukleotidhäufigkeiten in der 5'UTR von <i>E. coli</i>
1.3	Bastardbleichheit in <i>Pelargonium</i>
1.4	schematische Darstellung der Bastardbleichheit
3.1	schematische Darstellung der SD-Sequenz-Konstrukte
3.2	schematische Darstellung des transformierten Plastidengenoms
3.3	Nachweis transformierter Linien mittels Southern-Blot
3.4	Samentests von ausgewählten Transformanden
3.5	Phänotyp Tabaktransformanden
3.6	Transkriptmengen E. coli
3.7	GFP-Akkumulation in <i>E. coli</i>
3.8	Transkriptmengen <i>N. tabacum</i>
3.9	GFP-Akkumulation in <i>N. tabacum</i>
3.10	Translationsstärke gezeigt in Form von Polysomenbeladung
3.11	Chloroplastenisolation
3.12	DNA-Isolate aus Chloroplasten von <i>Pelargonium</i> Kultivaren
3.13	Plastidengenom von Pelargonium roseum
3.14	Verteilung der Insertionen in der LSC-Region
11	Phylogenetischer Stammbaum der untersuchten <i>Pelargonium</i> Plastidengenome 08
7.1	i nyiogenetischer Stammbaum der untersuchten i etargomant-i lästidengenome.
A.1	in silico-Faltung der 5' UTR von pOD 1 125
A.2	in silico-Faltung der 5' UTR von pOD 2 125
A.3	in silico-Faltung der 5' UTR von pOD 3 125
A.4	<i>in silico</i> -Faltung der 5' UTR von pOD 4
A.5	in silico-Faltung der 5' UTR von pOD 5 $\dots \dots $
A.6	in silico-Faltung der 5' UTR von pOD 6 126
A.7	in silico-Faltung der 5' UTR von pOD 7 $\dots \dots $
A.8	in silico-Faltung der 5' UTR von pOD 8 127
A.9	in silico-Faltung der 5' UTR von pOD 9 127
A.10	in silico-Faltung der 5' UTR von pOD 11
A.11	in silico-Faltung der 5' UTR von pOD 12
A.12	in silico-Faltung der 5' UTR von pOD 13
A.13	in silico-Faltung der 5' UTR von pOD 14
A.14	in silico-Faltung der 5'UTR von pOD 15
A.15	in silico-Faltung der 5' UTR von pOD 17
A.16	in silico-Faltung der 5' UTR von pOD 18
A.17	in silico-Faltung der 5'UTR von pOD 19
A.18	in silico-Faltung der 5' UTR von pOD 20
A.19	in silico-Faltung der 5' UTR von pOD 21
A.20	in silico-Faltung der 5' UTR von pOD 22
A.21	Plastidengenom von Pelargonium zonale cv. Stadt Bern
A.22	Plastidengenom von Pelargonium zonale cv. Trautlieb
A.23	Plastidengenom von Pelargonium roseum

## 1 Einleitung

Chloroplasten sind die grünen Organellen von Pflanzen, die sich aus einem Endosymbioseereignis herleiten. Ein photosynthetisch aktives Eubakterium und eine nicht photosynthetisch aktive eukaryotische Wirtszelle gingen eine intrazelluläre Symbiose ein (Bhattacharya und Medlin, 1998; Mereschkowsky, 1905). Die nächsten heute lebenden Verwandten dieser Eubakterien sind Cyanobakterien (Bhattacharya und Medlin, 1998; Martin *et al.*, 2002). Im Verlauf der Integration des Cyanobakteriums in den eukaryotischen Wirt, wurde ein Großteil der genomischen Information aus dem Plastiden in den Zellkern des Wirts übertragen (Martin und Herrmann, 1998), weshalb Plastiden heute ein deutlich reduziertes Genom von nur 100-200 Genen (Bock, 2007; Marin-Navarro *et al.*, 2007) im Vergleich zu mehr als 3000 Genen in Cyanobakterien (Kaneko *et al.*, 1996) enthalten. Das plastidäre Genom enthält genetische Information für Proteinkomplexe, die in der Photosynthese und in der Expression der auf dem Plastom kodierten Information eine Rolle spielen. Die Mechanismen zur Expression der genetischen Informationen des Plastoms ähneln prokaryotischen Systemen (Maliga, 1998; Zerges, 2000).

Ubereinstimmungen des Translationsapparates finden sich in den 70 S-Ribosomen, die aus 30 S- und 50 S-Untereinheiten bestehen, im Gegensatz zu eukaryotischen 80 S-Ribosomen. Die kleinere 30 S-Untereinheit enthält die Bindungsstellen zur Dekodierung der Information in der gebundenen mRNA, die größere 50 S-Untereinheit die Reaktionszentren zur Bildung von Peptidbindungen (Yamaguchi *et al.*, 2002). Im Laufe der Gentransfers des Endosymbionten an den Wirt wurde ein Großteil der Gene, deren Produkte am Aufbau der Ribosomen Anteil haben, an den Wirt übertragen. So ergab sich für die 30 S ribosomale Untereinheit eine Verteilung von 12 plastidär kodierten Genen und 13 Genen im Kerngenom. Die 50 S ribosomale Untereinheit wird aus Produkten von neun im Plastom und 24 im Kerngenom enthaltenen Genen aufgebaut. Im weiteren Prozess erhielten einige ribosomale Proteine des Plastiden im Vergleich zu *E. coli* zusätzliche Domänen, wie z.B. das S2-Protein in plastidären Ribosomen in Spinat (Yamaguchi und Subramanian, 2000). Weiterhin wurden fünf neue Proteine eingefügt, die kein Homolog in *E. coli* besitzen, und sechs *E. coli*-Proteine verloren, die keine Homologe in Plastiden besitzen (Yamaguchi und Subramanian, 2000; 2003; Yamaguchi *et al.*, 2000).

Zusätzliche Ähnlichkeiten der plastidären und prokaryotischen Systeme finden sich auf Ebene der mRNA. Hierzu gehören fehlende *Cap*-Strukturen und Poly(A)-Sequenzen am 3'Ende (Peled-Zehavi und Danon, 2007).

Eine weitere Gemeinsamkeit ist die Existenz von Sequenzen in der 5'UTR, die komple-



Abbildung 1.1: Der Translationsinitiationsmechanismus in *E. coli* nach Laursen *et al.* (2005). Die Ribosomenuntereinheiten sind in hellgrau (30 S) und dunkelgrau (50 S) dargestellt. Zusätzlich sind die Initiationsfaktoren IF 1 (rot), IF 2 (blau), IF 3 (grün), eine mRNA (gelb) und eine fMet-tRNA<sup>fMet</sup> (magenta) dargestellt.

mentär zu Teilen der 3'Sequenz der 16 S rRNA sind (Shine und Dalgarno, 1974). Diese Shine-Dalgarno-Sequenzen wurden in Transkripten aller bisher untersuchten Prokaryoten und Plastiden gefunden (Ma *et al.*, 2002; Zerges, 2000). Hierzu zählen unter anderem *Escherichia coli* als ein Vertreter der  $\gamma$ -Proteobakterien, *Synechocystis* und *Nostoc* als Beispiele für Cyanobakterien und Plastiden von *Nicotiana tabacum*, eine höhere Pflanze aus der Familie der Solanaceae.

### 1.1 Genexpression in *E. coli*

In Eubakterien, wie dem  $\gamma$ -Proteobakterium *E. coli*, sind alle Genexpressionsprozesse stark aneinander gekoppelt. Die Translation beginnt noch während der Transkription an der naszierenden mRNA (Peled-Zehavi und Danon, 2007). Aus diesem Grund findet die Regulation der Genexpression in *E. coli* hauptsächlich auf Ebene der Transkription statt. Betrachtet man die Translation, besteht diese aus vier Schritten. Hierzu zählen die Initiation, Elongation und Termination der Translation sowie die Ribosomendissoziation. Von diesen vier Schritten liegt der Schwerpunkt der Regulation auf der Translationsinitiation (Laursen *et al.*, 2005).

#### 1.1.1 Translationsinitiation in E. coli

Ribosomen befinden sich in einem Kreislauf aus Translationsinitiation, -elongation und -termination. Im Prozess der Translationstermination dissoziieren die Ribosomenuntereinheiten. Hierbei bindet der Initiationsfaktor 3 (IF 3) an die 30 S-Untereinheit des Ribosoms, stellt sie einer erneuten Initiation zur Verfügung und verknüpft somit Ribosomendissoziation mit Translationsinitiation. IF 3 erfüllt eine Vielzahl von Aufgaben. Hierzu zählen die Verhinderung der Reassoziation der Ribosomenuntereinheiten (Sacerdot et al., 1996), die Förderung der Dissoziation von tRNAs, die nicht der Initiator-tRNA entsprechen (Hartz et al., 1989) und die Förderung der Assoziation der mRNA mit der 30 S-Untereinheit und Basenpaarung der Initiator-tRNA mit dieser mRNA (Wintermeyer und Gualerzi, 1983). In bisher ungeklärter Reihenfolge binden nach IF 3 die folgenden weiteren Faktoren: die beiden Initiationsfaktoren IF1 und IF2–GTP, eine mRNA und eine korrekt beladene Initiator-tRNA (fMet-tRNA<sup>fMet</sup>) (Rinke-Appel et al., 1994; Barraud et al., 2008). IF 1 blockiert die A-Stelle der 30 S-Untereinheit, sodass an dieser Stelle keine tRNAs binden können. Für IF 2-GTP wurde gezeigt, dass dieser an die 30 S-Untereinheit und IF 1 bindet (Boelens und Gualerzi, 2002). Zusätzlich ermittelten Simonetti et al. (2008), dass IF 2 mit Stamm-Schleifen-Strukturen der Initiator-tRNA in Kontakt tritt und so zur Selektion der korrekten tRNA beiträgt (siehe auch Caserta *et al.*, 2006). Bei korrekter Bindung der für die Translationsinitiation benötigten Komponenten verändert IF 2 die Kinetik der Assoziation von 30 S- und 50 S-Untereinheit zu einem Gleichgewichtspunkt auf Seiten der Assoziation (McCarthy und Gualerzia, 1990; Rasmussen et al., 2008). So stellen die Initiationsfaktoren IF 1 und IF 2 sicher, dass die korrekte Initiator-tRNA an die 30 S-Untereinheit gebunden wird, und IF 3, dass es zu keiner Assoziation der Ribosomenuntereinheiten kommt, solange keine korrekt positionierte mRNA und tRNA an die 30 S-Untereinheit gebunden sind (Antoun *et al.*, 2006).

Der Mechanismus der Bindung der mRNA ist nicht vollständig geklärt. Entgegen einer direkten Bindung von Ribosomen an die SD-Sequenz (Zerges, 2000), schlagen Studer und Joseph (2006) sowie Vimberg *et al.* (2007) vor, dass die 30 S-Untereinheit unstrukturierte AU-reiche Sequenzen 5' der Shine-Dalgarno-Sequenz bindet (Qing *et al.*, 2003; Komarova *et al.*, 2002). *in vivo*-Experimente weisen ebenfalls auf eine zweistufige Bindung der Ribosomen an die mRNA hin (Zhang und Deutscher, 1992). Komarova *et al.* (2002) zeigten, dass diese "vorläufige" Bindung auf das ribosomale Protein S1 zurück geht. Anschließend geht die SD-Sequenz Basenpaarungen mit dem 3' Ende der 16 S rRNA ein und bildet einen offenen Initiationskomplex, der zu einer korrekten Positionierung des Startcodons in der P-Stelle des Ribosoms führt. Die korrekte Bindung aller Komponenten vorausgesetzt, geht der offene Initiationskomplex in einen geschlossenen Initiationskomplex über (siehe auch Kaminishi *et al.*, 2007). Die Bildung des offenen Initiationskomplexes kann durch Bindung einer einzelsträngigen Region der 5' UTR beschleunigt werden (de Smit und van Duin, 2003).

Im Laufe der Bindung der 50 S-Untereinheit des Ribosoms an diesen Komplex kommt es zu einer Dissoziation der IF 1 und IF 3 aus dem Komplex. Dies führt zu einer verstärkten GTPase-Aktivität des IF 2 und der Hydrolyse des gebundenen GTP. Anschließend verlassen GDP und IF 2 das vollständig assemblierte Ribosom. Komplexe aus Elongator-tRNAs und EF-Tu stellen anschließend die Grundlage zur Bildung der entstehenden Peptidkette dar. Während der Elongation dekodiert das Ribosom ein Codon nach dem anderen, was zu einer Translokation um drei Nukleotide nach jeder Peptidbindung führt. SD-Sequenzen führen während dieses Prozesses zu einer Verlangsamung der Elongationsreaktion (Wen *et al.*, 2008), was auf eine starke Bindung Ribosom-mRNA hindeutet.

Zusätzliche Faktoren, die die Translationsinitiation beeinflussen, sind *cis*- und *trans*- Faktoren. Hierzu zählt unter anderem die Sekundärstruktur der 5' UTR (de Smit *et al.*, 2008; Neupert *et al.*, 2008). Weiterhin kann die Ausbildung von Sekundärstrukturen als Grundlage für Proteinbindung dienen. So wurde der Einfluss der Sekundärstruktur und Proteinbindung für die Initiationsmechanismen der Translation der Threonin-tRNA-Synthetase (Schlax *et al.*, 2001; Schlax und Worhunsky, 2003; Jenner *et al.*, 2005), *rpsO* (Marzi *et al.*, 2007) und *rpsA* (Boni *et al.*, 2000; 2001) beschrieben. Als bisher wichtigstes Element in der Translationsinitiation wurde die SD-Sequenz identifiziert.

#### 1.1.2 Nachweise der Bedeutung von SD-Sequenzen in E. coli



Abbildung 1.2: Nukleotidhäufigkeiten in der 5'UTR von *E. coli*. Die Größe der Buchstaben ist ein Maß für die Häufigkeit des jeweiligen Nukleotids. Gut erkennbar ist das Startcodon (ATG) und die purinreiche SD-Sequenz zwischen -12 und -7 nt (nach Schneider und Stephens, 1990)

In *E. coli* befindet sich die Shine-Dalgarno-Sequenz in der 5' UTR eines großen Anteils (61%) der proteinkodierenden Gene in konserviertem Abstand von 4-7 nt zum Startcodon und ist komplementär zur Sequenz am 3' Ende der 16 S rRNA (Shine und Dalgarno, 1974; Chang *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 1994). Durch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen beiden komplementären Sequenzen wird die Bindung der mRNA an die 30 S-Untereinheit des Ribosoms verstärkt (Uemura *et al.*, 2007). Eine Bindung der SD-Sequenz und der Anti-SD-Sequenz (aSD-Sequenz) positioniert das Initiatorcodon im Bereich der P-Stelle des Ribosoms. Dies ist eine wesentliche Voraussetzung für die Translationsinitiation, da die A-Stelle der 30 S-Untereinheit damit frei für die Bindung einer zweiten Aminoacyl-tRNA ist und für die Translation genutzt werden kann.

Die Bedeutung der SD-Sequenz in E. coli wurde in verschiedenen Experimenten untersucht, die die hohen Transformationsraten von E. coli nutzen. Aus diesem Grund liegen für Prokaryoten überwiegend in vivo Daten vor. Hierzu zählen die Ergebnisse von Jacob et al. (1987), die zeigen, dass eine Mutation in der aSD-Sequenz zu einer massiven Veränderung der Translationsinitiation für eine Vielzahl von Transkripten führt. Eine Verringerung der Bindungsstärke des mRNA-Ribosom-Komplexes führte ebenso zu einer Verringerung der Proteinmenge, wie die Vergrößerung der Bindungsstärke durch die eingebrachte Mutation zu einer Verstärkung der Translation führte. Eine Verringerung der Bindungsstärke durch Verkürzung der SD-Sequenz führt ebenfalls zu einer Verringerung der Translationseffizienz (Vellanoweth und Rabinowitz, 1992). Weitere breit angelegte experimentelle Ansätze verfolgten Barrick et al. (1994) und Lee et al. (1996). So wurden mit Hilfe von Zufallsmutagenese Sequenzen in der 5'UTR ermittelt, die eine hohe Translationsinitiationsrate ermöglichen. Hierzu zählten die SD-Sequenz und Startcodons (Barrick et al., 1994). In weiteren Versuchen wurden Kombinationen der 5'UTR und dem 3' Ende der 16 S rRNA ermittelt, die der SD-Sequenz-aSD-Sequenz-Paarung ähneln (Lee et al., 1996). Es wurden purinreiche Sequenzen ähnlich der SD-Sequenzen ermittelt. Ebenso konnten von Park et al. (2007) durch Einzelnukleotidaustausche in der SD-Sequenz in vitro starke Veränderungen in der Translationsrate des Reportertranskripts qfp ermittelt werden.

Detaillierte Untersuchungen der SD-Sequenzen zeigten, dass diese in ihrer Effizienz der Translationsinitiation von ihrer Länge und dem Abstand zum Startcodon abhängig ist (Ringquist *et al.*, 1992). Es wurde eine direkte Korrelation der Translationsraten mit der Länge der SD-Sequenz festgestellt, wobei jedoch bei Überschreiten einer optimalen Länge ein Abfall der Translationsraten beobachtet wurde. Die Bedeutung der SD-Sequenz konnte durch Mutationen in dieser nachgewiesen werden. So zeigten schon kleine Veränderungen einen massiven Effekt auf die Translationsritiationsrate (Dunn *et al.*, 1978; Hall *et al.*, 1982). Eine Erhöhung der Translationsrate erzielten Fargo *et al.* (1998) in einem Experiment, in dem die Komplementarität der SD-Sequenz zur aSD-Sequenz erhöht wurde. Auch die Verlängerung der SD-Sequenz erhöhte die Translationsrate eines Reportergens. Eine weitere Verlängerung der SD-Sequenz und damit eine stärkere Basenpaarung führte jedoch zu einem Abfall der Initiationseffizienz (Vimberg *et al.*, 2007).

Keinen Effekt auf die Translation konnten Melançon *et al.* (1990) durch die Deletion der aSD-Sequenz ausmachen, wobei diese Versuche *in vitro* durchgeführt wurden. de Smit und van Duin (2003) heben jedoch die größere Zuverlässigkeit von *in vivo*-Daten gegenüber *in vitro*-Daten hervor.

Zusätzlich erlaubt die Bindung der SD-Sequenz eine Überwindung nachteiliger Sekundärstrukturen der 5' UTR (de Smit und van Duin, 1994), wenn diese Bindung in Konkurrenz zur Ausbildung der doppelsträngigen Bereiche der 5' UTR steht. Die gleiche Arbeitsgruppe um de Smit und van Duin (2003) ermittelte später, dass eine "vorläufige" Bindung an einzelsträngige Regionen der 5' UTR und anschließend die Bindung an die SD-Sequenz die Bindungskinetik der 30 S-Untereinheit der Ribosomen an die mRNA gut erklärt. Eine Entfaltung von strukturierter mRNA durch ein Ribosom und anschließende Bindung einer SD-Sequenz ist eine Voraussetzung für Translationskopplung (Yoo und RajBhandary, 2008). So werden in dicistronischen Transkripten ohne SD-Sequenz 5' des zweiten ORF im Vergleich zu Konstrukten mit SD-Sequenz nur 10 % der Proteinmenge gebildet (Spanjaard und van Duin, 1989), auch wenn die SD-Sequenz des zweiten ORFs durch Sekundärstrukturen verdeckt ist (Kimura *et al.*, 2005). SD-Sequenzen können im Zusammenspiel mit weiteren *cis*-Elementen, z.B. viralen Expressionssignalen, eine Verstärkung der Translationsinitiation bewirken (Gallie und Kado, 1989). Die in *E. coli* untersuchten SD-Sequenzen erzielten außerdem noch weitere Effekte. So konnten Jin *et al.* (2006) nachweisen, dass eine SD-Sequenz zur Selektion des korrekten Startcodons aus alternativen Startcodons beiträgt. Ähnlich lautende Ergebnisse erzielten Calogero *et al.* (1988), die in der SD-Sequenz eine wichtige Rolle in der Markierung des Startcodons sahen.

Weitere Effekte auf den Elongationsprozess wurden *in vitro* ausgemacht. So führten interne SD-Sequenzen zu einer Fixierung der Ribosomen an der mRNA und einem Pausieren des Translationsvorgangs (Wen *et al.*, 2008). Zusätzlich erkannten Giacco *et al.* (2008) eine geringere Fehlerrate während der ersten Reaktion in der Bildung der Polypeptidkette, wenn eine SD-Sequenz vorhanden ist. Außerdem konnte von Starmer *et al.* (2006) gezeigt werden, dass die Nutzung von GUG-Startcodons, die keine perfekte Basenpaarung zwischen Initiator-tRNA und Startcodon bilden können, vermehrt ermöglicht wird, wenn eine SD-Sequenz in der 5' UTR vorhanden ist.

Somit erfüllen SD-Sequenzen in *E. coli* Rollen in der festen Bindung der mRNA während der Translationsinitiation, Positionierung der 30S-Untereinheit des Ribosoms zum Startcodon und korrekten Beginn der Synthese der Polypeptidkette.

#### 1.2 Genexpression in Plastiden von N. tabacum

In Plastiden sind Transkription und Translation im Vergleich zu Prokaryoten weniger stark gekoppelt (Peled-Zehavi und Danon, 2007). Den Gentransfer vom Endosymbionten in den Zellkern begleitend, kam es im Laufe der Evolution hin zum Plastiden zu einer Verschiebung der Regulationsebene von der Transkription zur Translation (Gold, 1988; Kahlau und Bock, 2008). Dem Gentransfer folgend, besitzen dennoch zahlreiche kernkodierte Proteine ihren Wirkungsort im Plastiden, wodurch sich die Akkumulation von 1500 bis 4500 Proteinen im Plastiden ergibt (Richly und Leister, 2004; Sun *et al.*, 2004). Hiervon sind nur wenige Hundert Proteine für Stoffwechselreaktionen notwendig, weshalb für die restlichen Proteine eine regulatorische Funktion angenommen werden kann (Neuhaus und Emes, 2000).

Diverse der kernkodierten Proteine haben einen Effekt auf die Genexpression in Plastiden (Allison, 2000; Barneche *et al.*, 2006; Hedtke *et al.*, 2002; Rochaix *et al.*, 2004). So wird die plastidenkodierte RNA-Polymerase durch kernkodierte Sigma-Faktoren gesteuert (Allison, 2000) sowie die Transkription einiger plastidenkodierter Gene von kernkodierten RNA-Polymerasen durchgeführt (Hedtke *et al.*, 2002). Die anschließende RNA-Prozessierung wird ebenfalls von kernkodierten Proteinen, z.B. PPR-Proteinen, ermöglicht (Chateigner-Boutin *et al.*, 2008). Zusätzlich greifen kernkodierte Proteine in die Translation plastidärer Transkripte ein. Es konnte zusätzlich gezeigt werden, dass das Protein ATAB2 unter anderem einen Einfluss auf die Translation des psaA/psaB-Transkripts ausübt (Barneche *et al.*, 2006). Ebenso sind die Proteine MCA1 und TCA1 für die Akkumulation und Translation der *petA*-mRNA notwendig (Raynaud *et al.*, 2007). Um eine abgestimmte Regulation des Eingriffs kernkodierter Proteine in die Genexpression zu gewährleisten, entwickelte sich anterograde (Kern $\rightarrow$ Plastid) und retrograde (Plastid $\rightarrow$ Kern) Signalwege. Hierzu gehören unter anderem die Aktivierung der plastidären Transkription während der Chloroplastenentwicklung durch die kernkodierte RNA-Polymerase und die Signalisierung des energetischen Status des Plastiden (Bräutigam *et al.*, 2007).

#### 1.2.1 Translationsinitiation in N. tabacum-Plastiden

In Chloroplasten ist die Translation schwächer an die Transkription gekoppelt als in Prokaryoten (Danon, 1997; Peled-Zehavi und Danon, 2007) und die Translationsregulation ein Zusammenspiel von plastidären und nukleären Faktoren (Marin-Navarro et al., 2007). Zusätzlich zu diversen plastidenlokalisierten Proteinen wurden in Plastiden Orthologe für alle in E. coli an der Translationsinitiation beteiligten Proteine von Beligni et al. (2004) ermittelt (IF 1, IF 2 und IF 3). Auf Grund der Ähnlichkeit der eubakteriellen und plastidären Ribosomen, liegen ähnliche Mechanismen zur Initiation der Translation nahe. So konnte gezeigt werden (Zerges, 2000), dass die 30 S-Untereinheit der plastidären Ribosomen wie in E. coli an die drei genannten Initiationsfaktoren bindet. Zusätzlich sind jedoch eine Reihe weiterer kernkodierter Proteine für die Translation in Plastiden von Bedeutung (Manuell et al., 2007). So gibt es Hinweise auf die Regulation der Translation in Abhängigkeit von Licht bzw. des Redoxstatus des Plastiden. Hierbei greifen RNA-bindende Proteine in die Translationsinitiation ein (Barnes und Mayfield, 2003) oder ribosomale Untereinheiten interagieren direkt mit Thioredoxin (Balmer et al., 2004; Lemaire et al., 2004). Wie die Bindung der Proteine an die mRNA, so spielt ebenso die Beschaffenheit der 5'UTR eine wichtige Rolle für den Prozess der Translationsinitiation. In der 5' UTR befinden sich Bindungsstellen für Proteine, die in trans wirken (Schmitz-Linneweber et al., 2005b; Rochaix et al., 2004), sowie Sekundärstrukturen, die auf die Bindung von Ribosomen Einfluss haben können (Klinkert et al., 2006; Nakamoto, 2006). Inwieweit zusätzliche kernkodierte ribosomale Proteine, die keine homologen Proteine in *E. coli* besitzen, einen Effekt auf die Translation zeigen, ist nicht publiziert. Bisher wurden die PSRP genannten Proteine nur strukturell, jedoch nicht funktional, beschreiben (Yamaguchi und Subramanian, 2003). Weiterhin sind N- und C-terminale Erweiterungen von ribosomalen Proteinen (Manuell et al., 2007; Yamaguchi et al., 2000; Sharma et al., 2007) und Initiationsfaktoren (Yu und Spremulli, 1998) bekannt, bei denen ein Einfluss auf die Regulation der Translation

Spezies	SD-Sequenz essenziell	SD-Sequenz nicht essenziell
C. reinhartii E. ara cilis	psbA, psbD	petD, atpB, atpE, rps4, rps7
N. tabacum	atpE, psbC, rbcL, rps14	atpB, petB, psbA, rps12

Tabelle 1.1: Einfluss von SD-Sequenzen auf die Translation von Transkripten verschiedener Organismen (nach Peled-Zehavi und Danon, 2007).

vermutet wird (Peled-Zehavi und Danon, 2007). Für zu *E. coli* homologe ribosomale Proteine konnten, wie z.B. für das Protein PRPL11, ebenso homologe Funktionen bestimmt werden (Pesaresi *et al.*, 2001).

In E. coli sowie in Plastiden gibt es Hinweise auf einen Einfluss von A- bzw. U-reichen Sequenzen auf die Translationsinitiation. So konnten Hirose und Sugiura (1996) zeigen, dass solch ein Sequenzelement in der *psbA*-5'UTR über die Bindung eines Proteins Einfluss auf die Translation nimmt. Dass es sich bei dem bindenden Protein um das ribosomale S1-Protein handelt, zeigten Franzetti et al. (1992) und Alexander et al. (1998). Zu den cis-wirkenden Faktoren der Translationsinitiation zählen Sequenzen, die der SD-Sequenz ähnlich sind (Shine und Dalgarno, 1974). Diese zeigen Homologie zum 3' Ende der plastidären 16 S rRNA. Im Gegensatz zu SD-Sequenzen, die in Eubakterien gefunden werden, zeigen die potentiellen SD-Sequenzen des Plastiden jedoch einen deutlich geringeren Grad an Konservierung dieser Sequenz. Im Gegensatz dazu ist die Konservierung des 3' Endes der 16 S Ribosomenuntereinheit sehr stark (Fargo et al., 1998). Die bioinformatisch identifizierten potentiellen SD-Sequenzen befinden sich im weniger konservierten Abstand (Ruf und Kössel, 1988) von bis zu 100 nt zum Startcodon (Sugiura et al., 1998) im Gegensatz zum in E. coli gefundenen Abstand von 4-7 nt (Chen et al., 1994). Zwei Drittel der plastidären Transkripte von Tabak enthalten keine SD-ähnliche Sequenz in konserviertem Abstand zum Startcodon, jedoch über 60 % der Transkripte eine solche in 20 nt Abstand zum Startcodon.

In den nächsten frei lebenden Verwandten des Plastiden, den Cyanobakterien *Synecho-cystis* und *Nostoc* (Martin *et al.*, 2002), enthalten ca. 30 % der 5' UTRs eine SD-Sequenz in konserviertem Abstand zum Startcodon (Chang *et al.*, 2006). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass es bereits Variabilität innerhalb der Eubakterien gibt.

#### in vitro-Nachweise zur Wirksamkeit der SD-Sequenz

Die Untersuchung von *in vivo* Effekten von Manipulationen an SD-ähnlichen Sequenzen in transplastomischen höheren Pflanzen ist aufgrund der notwendigen Selektionsschritte sehr arbeitsaufwendig. Zur Umgehung dieses Schritts wurden *in vitro*-Methoden zur Detektion von Einflüssen von Veränderungen in SD-ähnlichen Sequenzen entwickelt. *in vitro*-Methoden wurden zur Untersuchung der Rolle von SD-ähnlichen Sequenzen in *Euglena gracilis* und *N. tabacum* genutzt. Der positive Einfluss der SD-Sequenz auf die Translationsinitiation, die im *atpH*-Transkript von *E. gracilis* ermittelt wurde, konnte so von Betts und Spremulli (1994) nachgewiesen werden. In der 5' UTR der *rbcL*-mRNA aus *E. gracilis* konnte keine SD-Sequenz identifiziert werden. Wurde jedoch eine Ribosomenbindestelle in die 5' UTR eingefügt, konnte eine Steigerung der Translationsinitiationsrate ermittelt werden (Koo und Spremulli, 1994).

Wie für Transkripte aus *E. gracilis* konnten auch für *N. tabacum* widersprüchliche Ergebnisse für die Rolle von SD-Sequenzen bzw. SD-ähnliche Sequenzen ermittelt werden. Im Transkript des Gens *rpl2* konnte durch Deletion der SD-ähnlichen Sequenz eine Verbesserung der Translationsinitiation erreicht werden, was bisher nur für dieses eine Transkript beobachtet wurde (Plader und Sugiura, 2003). Hier ist die Rolle von weiteren *cis*-Sequenzen bisher ebenfalls unklar. Kein Effekt von Mutationen der SD-Sequenz auf die Translation konnte bei weiteren Transkripten ermittelt werden. Hierzu zählen die Transkripte von *petB* und *rps12*, bei denen durch Mutation der SD-Sequenzen, die sich in unkonserviertem Abstand zum Startcodon befinden, keine Veränderung der Proteinmenge erkennen ließ (Hirose und Sugiura, 2004a).

Für die Transkripte der plastidären Gene atpE, rbcL und rps14 in N. tabacum (Hirose und Sugiura, 2004a; Hirose et al., 1998) konnte eine essentielle Rolle der SD-ähnliche Sequenz nachgewiesen werden. Ebenso konnte von Hirose und Sugiura (1996) nachgewiesen werden, dass zwei SD-ähnliche Sequenzen einen wesentlichen Effekt auf die Translation des psbA-Transkripts besitzen. In der 5'UTR des atpB-Transkripts konnte keine SDähnliche Sequenz ermittelt werden. Wird jedoch eine SD-Sequenz und ein Startcodon in die 5'UTR eingefügt, wird diese als Initiationsstelle genutzt (Hirose und Sugiura, 2004b). Kim und Mullet (1994) ermittelten mit Hilfe von "toeprinting" Analysen, dass Ribosomen aus Chloroplasten und E. coli die SD-Sequenz in der 5'UTR des rbcL-Transkripts an der SD-Sequenz binden. Zusätzlich wurde ein unterschiedliches Verhalten von E. coliund Plastidenribosomen ermittelt, wobei E. coli-Ribosomen eine SD-ähnliche Sequenz in psbA binden, jedoch plastidäre Ribosomen in der Nähe des Startcodons anzutreffen sind. Diese Bindung stellt einen wesentlichen Schritt im Prozess der Translationsinitiation dar und zeigt Unterschiede im Bindungsverhalten prokaryotischer und plastidärer Ribosomen deutlich auf. So band das eubakterielle plastidäre Ribosom an einer unkonservierten Stelle die 5'UTR von psbA. Eine weitere Rolle von SD-Sequenzen ist die Förderung der Translationsinitiation an ungewöhnlichen Startcodons. So wurden SD-Sequenzen in N. tabacum und Chlorella vulgaris identifiziert, die die Selektion eines GUG- bzw. UUG-Startcodons der Transkripte von *psbC* und *infA* ermöglichen (Kuroda *et al.*, 2007; Hirose *et al.*, 1999). Dies zeigt Parallelen zur Selektion von Startcodons in E. coli und Plastiden auf.

#### in vivo-Nachweise des Einflusses von SD-Sequenzen

*in vivo*-Untersuchungen in Plastiden beinhalten ausschließlich Untersuchungen am Modellorganismus *C. reinhardtii*, was auf eine hohe Transformationsrate mit Hilfe etablierter Transformationsprotokolle zurückzuführen ist. Auch mithilfe dieses Systems wurden widersprüchliche Daten – wie bei *in vitro*-Untersuchungen – ermittelt.

Untersuchungen an der petD-5'UTR ergaben keinen Effekt von Mutationen der SDähnlichen Sequenz (Sakamoto *et al.*, 1994). Ebenfalls keine Veränderung der Translationsinitiation ermittelten Fargo *et al.* (1998), nachdem sie die SD-ähnlichen Sequenzen der atpB-, atpE-, rps4- und rps7-5'UTRs mutiert hatten. Im Fall von atpE liegen somit zwei Datensätze vor (*in vitro* – Tabak, *in vivo* – Chlamydomonas), die widersprüchliche Ergebnisse lieferten. So zeigten N. tabacum-in vitro-Daten, dass der SD-Sequenz eine essentielle Rolle in der Translationsinitiation zukam (Hirose und Sugiura, 2004a). Die Chlamydomonas-*in vivo*-Daten zeigten jedoch, dass die SD-Sequenz für eine effiziente Translationsinitiation entbehrlich war (Fargo *et al.*, 1998).

Wurde eine SD-Sequenz in die 5' UTR der Gene atpB und rps4 eingefügt, erzielten Fargo et al. (1998) nur in *E. coli* eine höhere Translationsrate. Eine positive Rolle spielt die SD-Sequenz in der 5' UTR des Transkripts von psbA in *C. reinhardtii* (Mayfield et al., 1994). Ebenso konnte die SD-ähnliche Sequenz in der 5' UTR des psbD-Transkripts als für die Translation wesentliches *cis*-Element identifiziert werden (Nickelsen *et al.*, 1999).

Abschließend ist die Abhängigkeit der Ergebnisse zur Rolle der SD-Sequenz vom untersuchten Organismus auffällig. Dies spiegelt sich zum Beispiel in den Ergebnissen für *atpE* wider (Peled-Zehavi und Danon, 2007). Sequenzunterschiede in der 5'UTR können als Ursache der unterschiedlichen Abhängigkeit der Translationsinitiation in *N. tabacum* und *C. reinhardtii* nicht ausgeschlossen werden. Einen Einfluss der experimentellen Methode – *in vivo*- bzw. *in vitro*-Messungen – muss ebenfalls beachtet werden (de Smit und van Duin, 2003).

## 1.3 Zielstellung zur Untersuchung der Rolle von Shine-Dalgarno-Sequenzen in *E. coli* und Plastiden

Diverse Mutationsexperimente belegten die Funktion der SD-Sequenz als Ribosomenbindestelle. Diese Sequenz führt zu einer korrekten Positionierung der P-Stelle des Ribosoms relativ zum Startcodon (Kozak, 2005). Im weiteren Verlauf des Initiationsprozesses führt die Bindung weiterer Initiationsfaktoren zu einer korrekten Initiation der Translation.

In Plastiden höherer Pflanzen konnte kein klares Bild zur Rolle der SD-Sequenzen in der Translationsinitiation gezeichnet werden. So sind Ergebnisse zur Rolle der SD-Sequenz in verschiedenen Organismen, *in vitro* und *in vivo* ermittelt worden, die teilweise Widersprüche beinhalten. Bisher ist die Funktion der SD-Sequenzen in der 5' UTR plastidärer Transkripte unklar. Ebenso konnte die Rolle von SD-Sequenzen nicht *in vivo* in Plastiden höherer Pflanzen untersucht werden.

Ziel dieser Arbeit war es, systematisch die Rolle von SD-Sequenzen in Plastiden und im

Vergleich dazu in E. coli näher zu untersuchen.

Aufgeklärt werden sollte die Bedeutung von SD-Sequenzen in der 5' UTR von Transkripten des Reportergens gfp. Hierbei sollte untersucht werden, inwieweit die Verdopplung oder Verdreifachung von potentiellen Ribosomenbindestellen (SD-Sequenzen) bzw. Translationsinitiationsstellen (SD-Sequenz in Kombination mit Startcodon) einen Einfluss auf die Translationsinitiation hat. Zusätzlich wurde untersucht, inwiefern in Plastiden (und im Vergleich dazu in *E. coli*) Translationsreinitiation von Ribosomen stattfindet und inwieweit der Status des Ribosoms (Initiations- oder Elongationskomplex) hierbei eine Rolle spielt. Des Weiteren wurde untersucht, welchen Einfluss multiple Translationsinitiationsstellen (SD-Sequenz und Startcodon) im Vergleich zu einfachen Ribosomenbindestellen (SD-Sequenz) auf die Translationsinitiation haben.

## 1.4 Untersuchungen zur Bastardbleichheit in *Pelargonium*

Chloroplasten sind die photosynthetisch aktiven Organellen von Pflanzen. Sie verfügen über eine Vielzahl an Proteinen, die u.a. in der Photosynthese, der Lipidbiosynthese und der Aminosäuresynthese involviert sind. Zusätzlich enthalten diese Organellen ein eigenes Genom von ca. 150 kb, dessen Größe jedoch deutlich zwischen verschiedenen Arten schwanken kann. So findet man in parasitären Pflanzen Genomgrößen von nur 70 kb (*Epi-fagus virginiana*, Wolfe *et al.*, 1992) und in einigen Blütenpflanzen Genomgrößen bis zu 217 kb (*Pelargonium zonale*, Chumley *et al.*, 2006).

Im Vergleich zu den frei lebenden cyanobakteriellen Vorfahren, z.B. *Nostoc* und *Synecho-cystis*, besitzen Plastiden ein deutlich verkleinertes Genom. Dies ist auf einen massiven Gentransfer aus dem endosymbiotischen Organismus in den Zellkern zurückzuführen. Der Prozess des Transfers genetischen Materials ist auch heute noch zu beobachten (Huang *et al.*, 2004; Stegemann *et al.*, 2003; Stegemann und Bock, 2006). Heutige plastidäre Genome enthalten Gene für 4 rRNA-Moleküle, 30 tRNAs und ca. 80 Proteine.

Als Konsequenz aus dem Transfer genetischen Materials muss es zu einem Transport von Genprodukten zurück in den Plastiden kommen, um dessen Funktionsfähigkeit aufrecht zu erhalten. Nach der erfolgten Reduktion des plastidären Genoms von über 3000 auf ca. 120 Gene (Kaneko *et al.*, 1996; Bock, 2007), wurden Mechanismen entwickelt, die den Import von 1500 bis 4500 Proteinen ermöglichen (Richly und Leister, 2004; Sun *et al.*, 2004). Ein Import von RNA konnte bisher nicht stichhaltig gezeigt werden. Die Abstimmung der genetischen Systeme des Kerns und des Plastiden erfolgt über anterograde (Kern-Plastid) und retrograde (Plastid-Kern) Signale (Bräutigam *et al.*, 2007).

Neben dem genannten Gentransfer führen ebenso Mutationen und Umlagerungen im Plastidengenom statt. So konnten in einigen gut untersuchten Gattungen auch in nah verwandten Spezies Unterschiede in der Sequenz der plastidären Genome erkannt werden. Hierzu zählen die Spezies der Gattung *Oenothera* und *Pelargonium* (Gordon *et al.*, 1982; Metzlaff *et al.*, 1981). So wurden in *Oenothera* fünf und in *Pelargonium* vier verschiedene Plastidentypen gefunden (Gordon *et al.*, 1982; Metzlaff, 1983).

#### 1.4.1 Struktur- und Sequenzunterschiede plastidärer Genome

In Plastiden höherer Pflanzen konnten diverse Sequenzunterschiede ermittelt werden. So ist in einigen Familien zu beobachten, dass die viergeteilte Struktur des Plastoms aufgelöst wurde. Die viergeteilte Struktur der plastidären DNA besteht aus zwei invertierten Duplikationen ("inverted repeat", IR) und zwei Einzelsequenzen ("small" bzw. "large single copy region", SSC, LSC). Die inversen Duplikationen sind in einigen Leguminosen, Koniferen und *Geraniaceae* nicht ausgebildet. In allen weiteren höheren Pflanzen ist diese Struktur zwar vorhanden, jedoch gibt es auch hier massive Größenunterschiede. Das als Standardplastom etablierte Tabak-Plastom (Shinozaki *et al.*, 1986) gilt mit ca. 25 kb inversen Duplikationen als typische Plastomvariante der verschiedenen untersuchten Angiospermen. Im Gegensatz hierzu sind diese Bereiche in *Pelargonium zonale* mit ca. 76 kb durch Ausweitung in die Einzelregionen, deutlich vergrößert (Chumley *et al.*, 2006).

Zusätzlich zur Größe der Genome unterscheidet sich der Gengehalt, was unter anderem auf Duplikationen in den inversen Bereichen zurückzuführen ist. Ebenso unterscheidet sich die Anzahl an essentiellen Genen. Ein Beispiel hierfür ist das Gen accD, eine Untereinheit der Acetyl-CoA-Carboxylase. In Plastiden von Nachtschattengewächsen, wie Tomaten und Tabak, ist dieses Gen essentiell (Kahlau und Bock, 2008; Kode et al., 2005). In anderen Pflanzenfamilien – z.B. Poaceae – ist dieses Gen nicht mehr im Plastom enthalten (Katayama und Ogihara, 1996; Konishi et al., 1996) und vermutlich in den Kern transferiert. Gleiches trifft auch für Pelargonium zu (Chumley et al., 2006). Hier wurde gezeigt, dass nicht nur das accD-Gen nicht mehr im Plastom vorliegt, sondern auch die Sequenz für das Gen *rpoA*, eine Untereinheit der RNA-Polymerase, so stark im Vergleich zu anderen Pflanzen verändert ist, dass keine funktionale Kopie mehr ermittelt werden konnte (Chumley et al., 2006). Gleichzeitig kommt es im plastidären Genom von Pelargonium zu massiven Umlagerungen. Eine beträchtliche interspezifische Variabilität konnte unter anderem auch in verschiedenen Spezies der Gattung Oenothera und Familie der Fabaceae, ermittelt werden (Hachtel et al., 1991; Palmer et al., 1988). Im Rahmen der Umlagerungen ist häufig zu beobachten, dass Pseudogene oder duplizierte Gene im Plastom verbleiben. Als Ursache der Umlagerungen werden Inversionen durch homologe Rekombination diskutiert (Raubeson und Jansen, 2005). Als Erklärung für die Ausdehnung der invertierten Duplikationen in die Einzelsequenzen wird Genkonversion angenommen (Goulding *et al.*, 1996).

#### 1.4.2 Plastom-Genom-Inkompatibilität

Die Natur der Plastiden als Endosymbionten wurde von Mereschkowsky erstmals korrekt beschrieben (Mereschkowsky, 1905). Ebenso erkannte er die Notwendigkeit eines langen Evolutionsprozesses vom ersten Auftreten des Symbioseereignisses zum heutigen Zustand. Im Rahmen der Koevolution des Plastiden- und Kerngenoms kam es zu speziesabhängigen Anpassungen, die durch einen unterschiedlichen Grad an Gentransfer oder unterschiedliche Abhängigkeit von Kernfaktoren gekennzeichnet sind (Hagemann, 2001; Herrmann *et al.*, 2003). Zu diesen Kernfaktoren zählen unter anderem Untereinheiten von Proteinkomplexen und mRNA Prozessierungsfaktoren plastidärer Transkripte, wie z.B. Edierungsfaktoren (Bock *et al.*, 1994).

Die ersten Beobachtungen bezüglich der Plastom-Genom-Inkompatibilität wurden zu Beginn des 20. Jahrhunderts gemacht. Baur, Renner und Stubbe erkannten in den von ihnen durchgeführten Untersuchungen an *Pelargonium zonale* und *Oenothera spec.* den Charakter der Kern-Organellen-Inkompatibilität. Als Basis diente die Möglichkeit, Plastiden durch biparentale Vererbung der Organellen vor dem Hintergrund eines ausgetauschten Kerngenoms zu beobachten (Baur, 1909). Der Modus der biparentalen Plastidenvererbung wurde detailliert für *Pelargonium zonale* von Tilney-Bassett (1976) und Tilney-Bassett und Almouslem (1989) studiert. Es wurde ermittelt, dass sich der paternale Beitrag an Plastiden in den Hybriden bei verschiedenen Arten dieser Gattung unterscheidet, sodass in Zygoten unterschiedliche Verhältnisse von paternal und maternal vererbten Plastiden auftreten.

Als Phänotyp der Inkompatibilität der beiden Kompartimente in Hybriden wird häufig ein Ausbleichen bzw. eine fehlende Ergrünung des Gewebes beobachtet. Aus diesem Grund wird diese meist beobachtete Form der Plastom-Genom-Inkompatibilität auch als Bastardbleichheit bezeichnet (Hagemann, 2001). Der Grad der Ausbleichung kann in Abhängigkeit von äußeren Faktoren variieren (Schötz, 1958). Die Hybride zeigen auf Grund somatischer Segregation, der ungleichen Aufteilung der Plastiden beider Eltern auf Tochterzellen bei der Zellteilung während der Ontogenese, zwei Typen von Chimären. Als erstes sind Periklinalchimären zu nennen, die heterogene Zelllagen in den Blättern aufweisen (Tilney-Bassett, 1963). Die Schichtung bleicher und grüner Zelllagen geht auf eine Entmischung der Plastiden in den Stammzellen des Apikalmeristems zurück. Da die Gewebe eines Blattes aus einzelnen Zellgruppen des Apikalmeristems hervorgehen, kann die Entmischung der Plastiden in diesen Zellen dramatische Effekte auf die Blattentwicklung ausüben (Bergann und Bergann, 1959; Satina und Blakeslee, 1941). Eine weitere Form der Plastidenentmischung bei Bastardbleichheit bilden Sektorialchimären, deren Blätter oder Sprossachsen sektorial die Plastiden der Elternpflanzen aufgeteilt haben (Baur, 1909). Dies geht auf Sektoren von Zellen mit entmischten Plastiden im Apikalmeristem zurück (Baur, 1909).

Als molekulare Grundlage für die Bastardbleichheit ist die fehlerhafte Interaktion von plastidären und nukleären Faktoren denkbar, die einer Koadaptation unterlagen und durch die neue Kombination in den Hybriden ihre Funktion nicht korrekt ausführen (Schmitz-Linneweber *et al.*, 2005a). Hierzu zählt unter anderem mRNA-Prozessierung in Form von Edierung. Bei diesem Prozess werden durch Desaminierung auf RNA-Ebene konservierte Nukleotide wieder hergestellt (Bock *et al.*, 1994). Im Falle von fehlenden Edierungsfaktoren kommt es so zur Expression von Mutationen auf Proteinebene, was zur Fehlfunktion des entsprechenden Proteins führen kann (Schmitz-Linneweber *et al.*, 2005a).

Koadaptation ist die Konsequenz aus dem fortlaufenden Prozess des Gentransfers und der Koevolution des Plastiden- und Kerngenoms in isolierten Populationen. Die Folgen von Koadaptation, die zur Plastom-Genom-Inkompatibilität führen, wurden in *Oenothera* (Herrmann *et al.*, 2003) und *Pelargonium* (Metzlaff *et al.*, 1982) beschrieben und später, unter anderem auch in *Solanaceae* (Schmitz-Linneweber *et al.*, 2005a), näher untersucht.

#### Beispiele für Plastom-Genom-Inkompatibilität

**Solanaceae** bieten die Möglichkeit Plastiden und Kerngenome nah verwandter Arten künstlich zu kombinieren. Aufgrund der fehlenden biparentalen Plastidenvererbung muss bei der Herstellung der Hybriden auf Zellfusion somatischer Zellen und anschließende Regeneration von Pflanzen zurückgegriffen werden. Hierbei entstehen verschiedene Fusionsprodukte mit teilweise gemischten sowie homozygoten Kerngenomen. Hybride, die die cytoplasmatischen Komponenten eines Fusionspartners und das Kerngenom des anderen enthalten, werden als cytoplasmatische Hybride oder Cybride bezeichnet (Kushnir *et al.*, 1991).

Werden hierfür N. tabacum und Atropa belladonna genutzt, kommt es zu zwei unterschiedlichen Beobachtungen. Atropa-Plastiden bei nukleärem Tabak-Hintergrund bilden grüne Chloroplasten aus (Kushnir et al., 1987). Wird jedoch die entgegengesetzte Kombination gewählt, sind die N. tabacum-Plastiden in den hybriden Zellen nicht ergrünungsfähig (Kushnir et al., 1991). Mit Hilfe der vollständigen Sequenzaufklärung der Plastiden beider Spezies (Schmitz-Linneweber et al., 2002; Shinozaki et al., 1986) konnten detaillierte Untersuchungen angestellt werden, die den Verdacht auf eine unterschiedliche Abhängigkeit von RNA-Edierung lenkten. Die Aufklärung des Verdachts gelang mit Hilfe der genetischen Veränderung des Tabak-Plastoms (Svab und Maliga, 1993) und bestätigte sich mit der Abhängigkeit des Atropa-Plastoms von kernkodierten Edierungsfaktoren, die spezifisch die mRNA des Gens atpA modifizieren (Schmitz-Linneweber et al., 2005a).

**Die Gattung** *Oenothera* war zu Beginn des vergangenen Jahrhunderts ein bevorzugtes Untersuchungsobjekt zur Plastidenvererbung (Renner, 1924; 1934; 1936), wobei diese Gattung auch weiterhin intensiv untersucht wird (Cleland, 1972; Greiner, 2008; Harte, 1994; Stubbe und Raven, 1979).

In Oenothera wurden fünf Plastidengenome identifiziert (Gordon et al., 1982). Die Nukleotidsequenz dieser Plastidengenome konnte aufgeklärt und direkt miteinander verglichen werden (Greiner et al., 2008a;b; Hupfer et al., 2000), woraus jedoch keine klare Ursachen für die beobachtete Plastom-Genom-Inkompatibilität (Stubbe, 1959) hervorgingen. Die ermittelten Plastidengenome können durch Kreuzungen mit drei Haplotypen kombiniert werden. Durch Kombination der Haplotypen, sind folglich die fünf Plastidengenome mit sechs Kerngenomen kombinierbar (Stubbe, 1989). Es wurde ermittelt, dass aufgrund des biparentalen Erbgangs dieser Gattung in hybridem Material zwei Plastidentypen vorkommen können. Durch somatische Segregation kommt es zu einer Entmischung der Plastiden während der Ontogenese der Individuen. Durch aufwändige Kreuzungsversuche konnte aufgeklärt werden, welche Plastidengenome vor welchem nukleären Hintergrund Bastardbleichheit ausbilden (Lindenhahn et al., 1985; Stubbe, 1989). Die Bastardbleichheit äußert sich bei der Gattung Oenothera in einer Bandbreite von Phänotypen. So konnten unter



Abbildung 1.3: Bastardbleichheit in *Pelargonium*. Bastardbleiches Material in einer sektorialchimären Hybride aus *P. roseum* und *P. zonale* cv. Stadt Bern, wobei die von *P. zonale* cv. Stadt Bern vererbten Plastiden (Typ I) ausbleichen und die von *P. roseum* vererbten Plastiden (Typ R) vollständig ergrünen (nach Metzlaff, 1983).

anderem weiße und gelbe Blattfärbungen als Phänotypen ermittelt werden (Renner, 1936; Stubbe, 1959). Zusätzlich wurde ermittelt, dass es in den untersuchten Plastomtypen Unterschiede in der "Toleranz" gegenüber den Kerngenomen gibt. So behalten einige Plastidtypen in Kombination mit mehreren Kerngenomen ihre Ergrünungsfähigkeit, wohingegen andere Plastidengenome nur in Kombination mit einem bestimmten Haplotyp Chloroplastenentwicklung durchlaufen (Stubbe, 1959; 1989). Wurden die bleichen Plastiden wieder in den nativen nukleären Kontext gebracht, entwickelten wieder grüne Chloroplasten. Dies ist ein wesentliches Merkmal der Plastid-Genom-Inkompatibilität: Die Ergrünungsfähigkeit der Plastiden bleibt erhalten und ist nur vom nukleären Hintergrund abhängig. Es erfolgt keine Mutation des Plastidengenoms durch die Hybridisierung (Hagemann, 2001). Phylogenetische Untersuchungen stellen die Entwicklungsgeschichte der Oenothera-Plastidengenome dar und fassen die Unterschiede der fünf Genome zusammen. Diese Unterschiede sind im Vergleich zu den ermittelten Unterschieden innerhalb der Solanaceae deutlich zahlreicher. Mit Hilfe der Vergleiche konnten potentielle Auslöser der Bastardbleichheit identifiziert werden. Hierzu zählen Umlagerungen innerhalb der Plastome und Mutationen in intergenischen Regionen. Edierung wie bei den Solanaceae scheint eine untergeordnete Rolle zu spielen (Greiner *et al.*, 2008a;b).

**Pelargonium** zeigt ähnlich wie *Oenothera* Bastardbleichheit, wobei dieser Phänotyp ähnlich früh wie bei *Oenothera* beschrieben wurde (Baur, 1909). Seit dem 18. Jahrhundert unterliegt die Gattung *Pelargonium* mit ihrem Ursprung in Südafrika andauernden und intensiven Kreuzungen und Hybridisierungen (Grieger, 2007; James *et al.*, 2004). Bisher konnten für diese Gattung vier Plastidengenome identifiziert und drei durch die Untersuchung ihrer Restriktionsmuster näher beschrieben werden (Metzlaff, 1983). In der genannten Arbeit wurden diese als Plastomtyp I, II aus *P. zonale*-Hybriden und R aus *P. roseum* bezeichnet. In Kreuzungsversuchen, die ihren Anfang mit der Arbeit von Baur (1909) nahmen, wurden die Plastidentypen I und II als kompatible Partner in Kombination mit ihren jeweiligen Kerngenomen ermittelt. Das Plastidengenom Typ R und das entsprechende Kerngenom verursachte jedoch Bastardscheckungen in Kombination mit den beiden Plastidentypen I und II (Abb. 1.3). Hierbei zeigte sich, dass die Plastidentypen I und II weiße Plastiden ausbilden, wohingegen sich Plastiden des Typs R im gleichen nukleären Hintergrund zu normalen grünen Chloroplasten entwickelten. Hierbei zeigt sich eine wesentliche Eigenschaft der Bastardbleichheit in *Pelargonium zonale*. Sie lässt sich beispielsweise vor identischem nukleären Hintergrund in Plastiden des Typs I und nicht in Plastiden des Typs R beobachten (Metzlaff *et al.*, 1981; 1982). Daraus ließ sich folgern, dass die Bastardbleichheit in *Pelargonium* ein plastidenkodiertes Merkmal ist (Abb. 1.4). Aus diesen Beobachtungen konnte zusätzlich gefolgert werden, dass dieser Effekt dominant negativ ist, da die Bastardbleichheit bereits im heterozygoten Zustand auftritt. Auf mikroskopischer Ebene konnte beobachtet werden, dass die bastardbleichen Plastiden unter Lichteinfluss vakuolisieren (Hagemann, 2001).

Die Ursache der Bastardbleichheit wurde bisher nicht geklärt. Spekulationen über Sequenzunterschiede in der 5' Region der 5S rRNA als Ursache der Plastom-Genom-Inkompatibilität konnten bisher nicht bestätigt werden (Metzlaff, 1983). Weitere dominantnegative Effekte, die z.B. auf fehlerhafte RNA-Prozessierung ähnlich zur Plastom-Genom-Inkompatibilität zwischen *N. tabacum* und *A. belladonna* zurückzuführen sind, konnten ebenfalls nicht ermittelt werden.



Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der Entstehung der Bastardbleichheit. Durch Hybridisierung inkompatibler Plastiden- und Kerngenome verlieren inkompatible Plastiden ihre Ergrünungsfähigkeit (Typ I). Somatische Segregation in den F<sub>1</sub>-Hybriden führt zu gemischten oder entmischten weißen (Typ I) bzw. grünen (Typ R) Plastidenpopulationen in den Hybridzellen.

Weitere Pflanzengattungen zeigen ebenfalls Bastardbleichheit, womit dieser Phänotyp kein auf die genannten Gattungen begrenztes Phänomen ist. So konnte in Aronstabgewächsen ebenfalls Bastardbleichheit nachgewiesen werden (Yao *et al.*, 1994). Weiterhin konnte Plastom-Genom-Inkompatibilität von Hybriden in *Rhododendron* (Ureshino *et al.*, 1999) und *Epilobium* (Schmitz und Kowallik, 1986) nachgewiesen werden. Die Ursache der Plastom-Genom-Inkompatibilität ist in diesen Gattungen wie in *Oenothera* und *Pelargonium* nicht geklärt.

#### Dobzhansky-Muller-Inkompatibilität

Als Ursache der Inkompatibilität von Organellen- und Kerngenom können verschiedene Prozesse in Betracht gezogen werden. Hierzu zählen fehlerhafte Protein-Protein-Interaktionen, RNA-Prozessierung oder Mutationen in intergenischen Bereichen, die zu veränderten Expressionssignalen führen (Greiner *et al.*, 2008a). Als Ursache dessen wird eine Koadaptation von Plastiden- und Kerngenom betrachtet (Schmitz-Linneweber *et al.*, 2005a), wobei eine Ansammlung von Mutationen in beiden Genomen in Abhängigkeit zueinander zu keiner Reduktion der Fitness führt (Burke und Arnold, 2001). Wie von Metzlaff *et al.* (1982) in *Pelargonium* und Stubbe (1959) in *Oenothera* beobachtet, führte die Kombination von Organellen mit nicht koadaptierten Kerngenomen zur Inkompatibilität und zu photosynthetisch inaktivem Material.

Das Bateson-Dobzhansky-Muller-Modell (BDM) (Bateson, 1909; Dobzhansky, 1936; Muller und Pontecorvo, 1940) trifft für Kerngenome die Aussage, dass sich in Subpopulationen aufgeteilte ursprüngliche Populationen (aa/bb) unterschiedliche Allele (AA/bb bzw. aa/BB) fixieren können. Diese kommen in ihrem adaptierten Hintergrund vollständig ihrer Aufgabe nach. Werden sie allerdings durch Hybridisierung von Individuen der Subpopulationen wieder zusammengebracht (aA/bB), kann es zu einem epistatisch negativen Effekt des einen Allels über das andere kommen, was zu geringerer Fitness, z.B. geringerer Fruchtbarkeit, führen kann (Burke und Arnold, 2001). Beschrieben wurde das Modell der Inkompatibilität für die Interaktion verschiedener Kerngenome, wie der von Helianthus annuus und H. petiolaris. Da große Bereiche des Kerngenoms von Umlagerungen und Inversionen betroffen sind, ist es bisher nicht gelungen die ursächlichen Unterschiede der Genome für die Inkompatibilität zu ermitteln. Weitere Ergebnisse erzielten Wang et al. (2006) bei der Untersuchung von Hybriden aus Arabidopsis thaliana und A. arenosa. Hier konnte eine unerwartete Veränderung der Transkriptmuster im Vergleich zu den Elternpflanzen ermittelt werden, wobei sich A. arenosa in einigen Transkripten als dominant erwies. Die Identifikation einzelner Gene, die die Abgrenzung von Arten untereinander bewirken, führte zur Bildung des Begriffs Speziesgene bzw. Artbildungsgene. Solche konnten bisher in Drosophila und Reis entdeckt werden. Brideau et al. (2006) zeigten, dass Hybridpopulationen aus D. melanogaster und D. simulans keine männlichen Individuen aufgrund der Interaktion zwischen den Genen lhr (D. simulans) und hmr (D. melanogaster) enthalten. Eine gestörte Interaktion dieser Gene durch Mutation eines Partners annullierte diesen Effekt. Ähnliches konnte in Reis von Jiang *et al.* (2008) beobachtet werden. Hier interagieren die Gene *hwh1* und *hwh2* miteinander, wodurch die Fitness der Hybridpflanzen in Form der Samenproduktion massiv zurückgeht. Hierdurch ergibt sich ein Selektionsnachteil für die Hybriden und die Trennung der Subpopulationen weiter voranschreitet. Dass Plastiden ebenfalls in die Inkompatibilität von Spezies involviert sind, zeigt das Beispiel *Oenothera* (Stubbe und Raven, 1979). Ähnliche Ergebnisse wurden von Pohlheim (1986) ermittelt, der Plastom-Genom-Inkompatibilität zwischen *Pelargonium zonale* und *P. inquinans* untersuchte. Inkompatible Eltern erzeugten Hybride, die eine geringere Fitness durch eine behinderte Plastidenentwicklung und damit verringerte bzw. fehlende Photosyntheseleistung besitzen.

## 1.5 Zielstellung zur Untersuchung der Bastardbleichheit in *Pelargonium zonale*

Die Ursache von Bastardbleichheit als Konsequenz von Plastom-Genom-Inkompatibilität ist bislang noch nicht verstanden. Voraussetzung zur Untersuchung dieses Phänomens ist die Möglichkeit zur Hybridisierung verschiedener Arten oder Kultivare. Mit *Pelargonium* zonale-Hybriden liegt eine Vielzahl verschiedener Kultivare vor, die sowohl untereinander als auch mit anderen Arten der Gattung *Pelargonium* hybridisiert werden können (Harney und Chow, 1971; Pohlheim, 1986). Zu diesen Kultivaren zählen unzählige Hybride, die auf die Art *Pelargonium zonale* zurückzuführen sind (Metzlaff, 1980) und im Rahmen dieser Arbeit durch *P. zonale* cv. Stadt Bern und *P. zonale* cv. Trautlieb vertreten sind. Diese konnten mit *P. roseum*, einer andere Art der Gattung *Pelargonium*, zusätzlich gekreuzt werden, wobei in den Nachkommen Plastom-Genom-Inkompatibilität in Form von Bastardbleichheit beobachtet werden konnte.

Voraussetzung für die Beobachtung dieser Inkompatibilität ist die biparentale Plastidenvererbung in der Gattung *Pelargonium* (Baur, 1909). Die erfolgreiche Hybridisierung der *Pelargonium*-Arten über Speziesgrenzen hinweg ist in dieser Gattung möglich. Jedoch zeigte sich in der Ausbildung der Bastardbleichheit ein Zeichen der Aufrechterhaltung von Artgrenzen durch Reduktion der Fitness der Nachkommen (Burke und Arnold, 2001). Zur Aufklärung der Ursache der Plastom-Genom-Inkompatibilität ist vergleichende Genomsequenzierung ein probates Mittel (Schmitz-Linneweber *et al.*, 2005a).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Phänomen der Bastardbleichheit in Hybriden aus verschiedenen Kultivaren von *Pelargonium zonale* untersucht (Metzlaff, 1980; 1983). Hierzu zählt als eine der ursprünglichen *Pelargonium*-Arten *Pelargonium roseum*, *P. zonale* cv. Stadt Bern (Plastidentyp I) und *P. zonale* cv. Trautlieb (Plastidentyp II) (Metzlaff, 1980). Durch Sequenzierung und Vergleich der Plastidengenome aller drei Kultivare sollte die Ursache der Bastardbleichheit in *Pelargonium zonale* weiter untersucht werden, die seit einiger Zeit einer Aufklärung harren (Baur, 1909; Metzlaff, 1983). Anschließend ergibt sich die Möglichkeit Mechanismen zur Artbildung und deren molekulare Grundlagen aufzudecken.

## 2 Materialien und Methoden

### 2.1 Abkürzungen

APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
BAP	N6-Benzyladenin
BSA	Rinderserumalbumin
CTAB	Cetyltrimethylammonium bromid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DTT	1,4-Dithiothreitol
EGTA	Ethylenglycoltetraacetat
EDTA	${ m Ethylendiamintetraacetat}$
GFP	grün fluoreszierendes Protein
IR	Inverted Repeat (invertierte Duplikation)
LSC	Large Single Copy region (große Einzelregion)
NAA	Naphthylessigsäure
ORF	Open Reading Frame (offenes Leseraster)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
POD	Meerrettichperoxidase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SD-Sequenz	Shine-Dalgarno-Sequenz
SSC	Small Single Copy region (kleine Einzelregion)
Tris	${ m Tris}({ m hydroxymethyl})$ -aminomethan
TEMED	${ m N,N,N',N'}$ -Tetramethylethylendiamin
UTR	untranslatierte Region

### 2.2 Lösungen

#### Lösung I für Plasmidisolation aus E. coli

 $50 \ \mathrm{mM}$  Glukose,  $10 \ \mathrm{mM}$  EDTA,  $25 \ \mathrm{mM}$  Tris

- Lösung II für Plasmidisolation aus *E. coli* 0,2 M NaOH, 1 % SDS
- Lösung III für Plasmidisolation aus  $E. \ coli$ 3 M CH<sub>3</sub>COOK

#### **CTAB-Puffer**

2~% CTAB, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris, 100 mM  $\beta\textsc{-Mercaptoethanol},$  pH 8

(Doyle und Doyle, 1987)

#### TE-Puffer

 $10\;\mathrm{mM}$  EDTA,  $100\;\mathrm{mM}$  Tris, pH 8

#### ${\bf RNA}\text{-}{\bf Extraktion spuffer}$

 $100 \ \mathrm{mM}$  Tris;  $100 \ \mathrm{mM}$  LiCl;  $10 \ \mathrm{mM}$  EDTA;  $1 \ \%$  SDS; pH 8;  $50 \ \%$  was serges ättigtes Phenol

(Verwoerd et al., 1989)

#### Proteinisolationspuffer

- I 50 mM HEPES, 10 mM CH<sub>3</sub>COOK, 5 mM (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Mg, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM Pefablock (Roth), pH 7,5 (Kuroda und Maliga, 2001)
- II 50 mM HEPES, 300 mM NaCl, 0.5 % SDS, pH 8

#### Gelpuffer für PAGE (Schaegger und von Jagow, 1987)

 $0,1\,\%$  SDS,  $3\,\mathrm{M}$  Tris, pH 8,9

- Kathodenpuffer für PAGE (Schaegger und von Jagow, 1987) 0,1 M Tris, 0,1 M Tricin, 0,1 % SDS, pH 8,25
- Anodenpuffer für PAGE (Schaegger und von Jagow, 1987) 0,2 M Tris, pH 8,9
- 3× Ladepuffer für PAGE (Schaegger und von Jagow, 1987) 36 % Glycerol, 0,15 M Tris pH 6,8, 12 % SDS, 0,3 M DTT, 0,03 % Coomassie G250
- Elektrodenpuffer für PAGE (Laemmli, 1970) 25 mM Tris, 1,44 % Glycin, 1 % SDS, pH 8,3
- Trenngelpuffer für PAGE (Laemmli, 1970) 1,5 M Tris pH 8,8

#### Sammelgelpuffer für PAGE (Laemmli, 1970) 0,5 M Tris, pH 6,8

#### $6 \times$ Ladepuffer für PAGE (Laemmli, 1970)

 $375\,\mathrm{mM}$ Tris pH 6,8,60~%Glycerol, 12,6%SDS, $600\,\mathrm{mM}$ DTT, 0,09%Bromphenolblau

#### Transferpuffer für "Semidry"-Transfer

 $25\,\mathrm{mM}$  Tris,  $192\,\mathrm{mM}$  Glycin

#### **TBS**–**T** für Western Blot

 $200 \ \mathrm{mM}$  Tris,  $1370 \ \mathrm{mM}$  NaCl,  $0,1 \ \%$  Tween–20, pH 7,4

#### Polysomenisolationspuffer

0,2 M Tris, 0,2 M KCl, 35 mM MgCl<sub>2</sub>, 25 mM EGTA, 0,2 M Saccharose, 1 % Triton X–100, 2 % Polyoxyethylen-10-Tridecylether, 0,5 mg/ml Heparin, 0,1 M  $\beta$ -Mercaptoethanol, 100  $\mu$ g/ml Chloramphenicol, 25  $\mu$ g/ml Cycloheximid, pH 9

#### Lösung für Saccharosegradienten

40 mM Tris, 20 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM EGTA, 56/40/30/15% Saccharose, 0,5 mg/ml Heparin, 100  $\mu$ g/ml Chloramphenicol, pH 9

#### Hybridisierungspuffer/Church-Puffer

 $1\,\%$  BSA;  $1\,\mathrm{mM}$  EDTA;  $0.5\,\mathrm{M}$  NaH\_2PO4;  $7\,\%$  SDS; pH 7,2 (Church und Gilbert, 1984)

#### Waschpuffer II für Northern- und Southern-Hybridisierungen

 $0,5\times$  SSC;  $0,1\,\%$  SDS

#### $\mathbf{20\times~SSC}$

3 M NaCl; 0,3 M Na<sub>3</sub>Citrat

#### Puffer A für Chloroplastenisolation

0,3 M Saccharose, 50 mM Tris, 50 mM EDTA, 0,1 % BSA, 3 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, 0,5 % Polyvinylpyrrolidon-10, pH 8

#### Puffer B für Chloroplastenisolation

0,3 M Saccharose,  $50\,\mathrm{mM}$  Tris,  $50\,\mathrm{mM}$  EDTA, pH 8

#### Puffer C für Chloroplastenisolation

 $50\,\mathrm{mM}$  Tris,  $25\,\mathrm{mM}$  EDTA,  $25\,\mathrm{mM}$  MgCl<sub>2</sub>, pH 8 versetzt mit  $30\,\%,\;45\,\%$  bzw.  $60\,\%$  Saccharose

#### Chloroplastenlysepuffer

50 mM Tris, 20 mM EDTA, 2 % Laurylsarkosin, pH 8

## 2.3 Oligonukleotide

Name	Sequenz 5' $\rightarrow$ 3'
GFP-Mon-R	GGGAGAAGCACTGAACACC
P16Srrn-F	CAAGCGGTGGAGCATGTGG
P16Srrn-R	GGCGGTGTGTACAAGGCCC
P7247	CCCAGAAAGAGGCTGGCCC
P7244	CCCAAGGGGCGGGGAACTGC
PaadA136	TCGATGACGCCAACTACC
PZF9	TTTTCATATGAGTAAAGGAGAAGAACTT
PZF10	TTTTATTAATGATTAGTTCATCCATGCC

Tabelle 2.1: V fettgedruck	erwendete Oligonukleotide zur Herstellung der 5'UTR-Insertionen. Die SD-Sequenzen sind <u>unterstrichen</u> und Start- bzw. Stopcodons sowie Mini-ORF c dargestellt.
Name	Sequenz $5' \rightarrow 3'$
POD1-F	GATCCAAATACTGCAGTTTAACTTTAA <u>GAAGGAG</u> ATATACC CATGGGTATATCTCCTTCTTAAAGTTAAAGTAGCAGTATTTG
POD2-F	GATCCAAATACTGCAGCTTAGAATATTGAAGGAGATATAACCCATCTATTATAAATAGTGCA
POD2-R	CTATTTATAATAGATGGGTATATCTCCTTCAATATTCTAAGCTGCAGTATTTG
POD 3-F	GATCCAAATACTGCAGAGATACAATAA <u>GAAGGAG</u> ATATACCCCATCTGTATTAAATAGTGCA
POD3-R	CTATTTAATACAGATGGGTATATTCTCCTTCTTATTGTATCTCTGCAGTATTTTG
POD4-F POD4-R	GIIIAOUIIIAGAAGGAGAIAIAOALAIGIAAGAAGAGAGAIAIAOO CATGGGTATATCTCCTTCTTATACATATGTATGTCTCCTTCTTAAGGTTAAACTGCA
POD5-F	GTTTAACTTTAA <u>GAAGGAG</u> ATATACAT <b>ATGTAAG</b> TAA <u>GAAGGAG</u> ATATACAT <b>ATGTAA</b> TAA <u>GAAGGAG</u> ATATACC
POD5-R	CATGGGTATATCTCCTTCTTATTACATATGTATATCTCCTTCTTACTACATATGTATATCTCCTTCTTAAAGTTAAACTGCA
POD6-F	GTTTAACTTTTAA <u>GAAGGAG</u> TAA <u>GAAGGAG</u> ATATACC
POD6-R	CATGGGTATATCTCCTTCTTACTCCTTCTTAAAGTTAAACTGCA
POD7-F	GTTTAACTTTTAA <u>GAAGGAG</u> TAA <u>GAAGGAG</u> TAA <u>GAAGGAG</u> ATATACC
POD7-R	CATGGGTATATCTCCTTCTTACTCCTTCTTACTCCTTCTTAAAGTTAAACTGCA
POD8-F	GTTTAACTTTTAA <u>GAAGGAG</u> ATATACAT <b>ATGGGTTAA</b> TAA <u>GAAGGAG</u> ATATACC
POD8-R	CATGGGTATATCTCCTTCTTATTAACCCATATGTATATCTCCTTCTTAAAGTTAAACTGCA
POD9-F	GTTTAACTTTAA <u>GAAGGAG</u> ATATACAT <b>ATGGGATAG</b> TAA <u>GAAGGAG</u> ATATACAT <b>ATGGGTTAA</b> TAA <u>GAAGGAG</u> ATATACC
POD9-R	CATGGGTATATCTCCTTCTTATTAACCCATATGTATATCTCCTTCTTACTATCCCATATGTATATCTCCTTCTTAAAGTTAAACTGCA
POD10-F	CATGGGTGAAAATTTATATTTTCAAAG
POD10-R	CATGCTTTGAAAATATAAATTTTCACC
POD11-F	GTTTAACTTTAA <u>GAAGGAG</u> ATATACAT <b>ATG</b> GGA <u>GAAGGAG</u> ATATACC
POD11-R	CATGGGTATATCTCCCTTCTCCCATATGTATATCTCCCTTCTTAAGGTTAAAGTTAAACTGCA Ammu Aammu A A A A A A A A A A A A A A A A A A
POD12-F POD19-R	ЧТІ ТААЧТІ ТАА <u>ФААФАА</u> ТАТАЧАТ <b>АТ Ч</b> ЧФА <u>АБФАБ</u> АТАТАЧАТ <b>АТ Ч</b> ЧЧА <u>ЧАЧБАТА</u> ТАТАЧ. С АТФФФТАТАТСТРСТТСТРССАТАТФТСТРСТТСТТССТТССТАТАТСТРСТТСТТТА А АФТАСТСТТСТТА А АФТАСА
POD13-F	GTTTATCTTTAT <u>GAAGAAGAAGAA</u> ATATACC
POD 13-R	CATGGGTATATCTCCTTCATAAGATAAACTGCA
POD14-F	GATCCAAATACTGCAGCTTACAATATT <u>GAAGGAG</u> ATATACAT <b>ATG</b> GGTATTATAATAGTGCA CTATTAAAAAGCCAATATATATATATATATATATATAATAGAAGAAAAATATAG
	Ο ΤΗ ΤΗ ΙΥΓΗΛΟΛΗΤΑΙ ΤΟ ΤΑΛΙΤΑΙ ΤΟ ΤΑΛΙΤΑΙ ΤΟ ΤΑΛΙΑΙ ΤΟ ΤΑΛΙΑΙ ΤΟ ΤΑΛΙΑΙ ΤΟ ΤΑΛΙΑΙ ΤΟ ΤΑΛΙΑΙ ΤΟ ΤΑ

### 2.4 Materialien

Von dieser Aufzählung sind Verbrauchsmaterialien, die zur Standardausrüstung eines Labors zählen, ausgeschlossen. Soweit nicht anders angegeben, wurden die verwendeten Chemikalien von Merck (Darmstadt), Sigma (München), Roth (Karlsruhe) oder Duchefa (Niederlande) bezogen.

Reaktionskits

	BCA Protein Assay	Pierce, Rockford, USA
	ECL Plus	GE Healthcare, Freiburg, Deutschland
	MegaPrime Kit	GE Healthcare
	Nucleobond AX	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
	NucleoSpin Extract	Macherey-Nagel
Chemikalien		
	0,5-10 kb RNA Marker	Invitrogen, Paisley, UK
	$0,6\mu{ m m}~{ m Goldpartikel}$	$\operatorname{BioRad}$ , USA
	$\operatorname{GeneRuler}$	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
	Hyperladder V	Bioline, Ludwigsfelde, Deutschland
	LivingColors A.v. monoclonal	Clontech, Mountain View, USA
	Antibody (JL-8) (antiGFP)	
	Rabbit anti Mouse	Sigma-Aldrich, München, Deutsch- land
	Rotiquant	Roth, Karlsruhe, Deutschland
	TriFast	PeqLab, Erlangen, Deutschland
Verbrauchsmaterialien		1 ) 0 )
	Acrylamid Gel 40 (29:1)	Roth
	Hybond P (PVDF–Membran)	GE Healthcare
	Kodak BioMax XAR Film	Sigma-Aldrich
	Miracloth	Calbiochem/VWR, Darmstadt,
		Deutschland
	Rotiphorese Gel A	$\operatorname{Roth}$
	Rotiphorese Gel B	$\operatorname{Roth}$
Geräte	1	
	${ m Gradient}{ m enmischer}$	ltf Labortechnik, Wasserburg,
		Deutschland
	Growbanks	CLF Laborgeräte, Emersacker,
		Deutschland
	Optima L 80–XP	Beckman Coulter, Krefeld, Deutsch-
	-	land
	PDS-100/He	BioRad, Hercules, USA
	Sonifier $W-250D$	Branson, Danbury, USA
	SW-60Ti	Beckman Coulter
	Typhoon Trio+	GE Healthcare
	Waring-Blender 8010E	Waring Commercial, New Hartford,
	0	USA
Software und Datenbanken		
	GenBank	http://www.ncbi.nlm.nih.gov
	$\operatorname{ImageQuant}$	GE Healthcare
	Vector NTI	Invitrogen
Software und Datenbanken	GenBank ImageQuant Vector NTI	USA http://www.ncbi.nlm.nih.gov GE Healthcare Invitrogen

### 2.5 Klonierung der SD-Sequenz-Konstrukte

Als Basis der Konstrukte wurde der Chloroplastentransformationsvektor pRB 95 (Ruf *et al.*, 2001) gewählt und das Plasmid pDK 45, ein Plasmid mit pBluescript SK (+)-Gerüst

(Stratagene, La Jolla, USA) und einer Expressionskassette für gfp mit ribosomalem rRNA-Operon-Promotor (*N. tabacum*-Plastidengenom) und rps16 Terminator (*N. tabacum*-Plastidengenom). In die multiple Klonierungsstelle von pRB 95 wurde die gfp Expressionskassette des Plasmids pDK 45 nach Verdau mit den Restriktionsenzymen SacI und HindIII mit Hilfe einer T4 DNA-Ligase (Fermentas) nach Herstellerprotokoll eingefügt. Das resultierende Plasmid pRB 95-GFP enthält das pRB 95-Grundgerüst mit zwei Selektionsmarkern: Die kodierende Region für  $\beta$ -Lactamase, aktiv in *E. coli*, und dem Gen für die Aminoglycosid-3'-Adenylyltransferase, in Plastiden genutzt. Zusätzlich enthält pRB 95-GFP das GFP-kodierende Gen unter Kontrolle des stark exprimierten Promotors für das rRNA Operon (De Cosa *et al.*, 2001) mit der 5'UTR des *prfA*-Gens aus *Listeria monocytogenes* und *rps16* Terminator. Mit Hilfe des gewählten Promotors wurde das *gfp* sowohl in *E. coli* als auch in Plastiden exprimiert. Anschließend konnte mit Hilfe von synthetischen Oligonukleotiden (Kap. 2.3) die *prfA*-5'UTR ausgetauscht werden.

Die synthetischen Insertionen bestanden aus doppelsträngiger DNA, die mit Hilfe von einzelsträngigen Oligonukleotiden erzeugt wurde.

Die Oligonukleotide wurden äquimolar (je 50  $\mu$ M) gemischt, auf 94 °C erhitzt und mit 3,6 K/min auf 20 °C abgekühlt. Nach erfolgter Aneinanderlagerung der Einzelstränge lagen DNA-Doppelstränge mit einem Überhang kompatibel zu den benötigten Restriktionsenzymen vor.

Zur Herstellung des Plasmids pOD 1 (Abb. 3.1) wurde das Plasmid pRB95-GFP mit *Bam*HI und *Nco*I geöffnet und anschließend das entsprechende Oligonukleotid (5' *Bam*HI-Überhang, 3' *Nco*I-Überhang) eingefügt. Zur Herstellung des Plasmids pOD 2 wurde pOD 1 mit *Bam*HI und *Pst*I geöffnet und das Oligonukleotid (5' *Bam*HI-Überhang, 3' *Pst*I-Überhang) inseriert. pOD 3 basiert analog auf pOD 2.

Die Plasmide pOD 4, 5, 6, 7, 8 und 9 basieren ebenfalls auf pOD 1. Dieses wurde für diese Klonierung mit *Pst*I und *Nco*I geöffnet und die entsprechenden Oligonukleotide (5' *Pst*I-Überhang, 3' *Nco*I-Überhang) eingefügt.

Die Einführung einer Tabak-Ätzvirus-Peptidaseschnittstelle (TEV-Schnittstelle) wurde ebenfalls über die Insertion eines Oligonukleotids durchgeführt. Hierfür wurde das Plasmid pOD 1 mit *NcoI* gespalten, das Konstrukt für pOD 10 ungerichtet eingefügt und mittels Sequenzierung (MWG Biotech, München) Klone mit korrekter Orientierung der Insertion identifiziert. Das resultierende Plasmid (pOD 10) diente analog zu pOD1 als Grundlage für die Herstellung der Plasmide pOD 11 (pOD 4) und pOD 12 (pOD 5). Das Plasmid pOD 13 resultierte aus dem Austausch der 5'UTR des Plasmids pOD 10 nach Spaltung mit *Bam*HI und *NcoI* und anschließendem Einfügen der entsprechenden Insertion. Das Plasmid pOD 13 diente nach Spaltung mit *Bam*HI und *PstI* als Grundlage für das Plasmid pOD 14. Das Plasmid pOD 15 konnte durch die Spaltung des Plasmids pOD 14 mit *Bam*HI und *PstI* und die Insertion des Oligonukleotids für pOD 14 gewonnen werden, wodurch zu einer Verdopplung des pOD 14 SD-Sequenzbereichs kam. pOD 22 basiert dementsprechend auf pOD 15 und führte zu einer Verdreifachung des SD-Sequenzbereichs. Die letztgenannten Plasmide pOD 11-22 enthalten eine TEV-Schnittstelle. Analog zur Herstellung dieser Plasmide wurde pOD 1 als Basis verwendet, die folgenden Konstrukte zu generieren, wobei die entsprechenden Plasmide mit TEV-Schnittstelle in Klammern angegeben sind: pOD 17 (pOD 11), pOD 18 (pOD 12), pOD 19 (pOD 13), pOD 20 (pOD 14), pOD 21 (pOD 15).

### 2.6 Genetische Transformation

#### 2.6.1 Transformation von Tabakplastiden

Makronährelemente		Makronährelemente	
$\begin{array}{c} 1,9\ {\rm g/l} \\ 0,37\ {\rm g/l} \\ 0,44\ {\rm g/l} \\ 0,17\ {\rm g/l} \\ 1,65\ {\rm g/l} \end{array}$	$\begin{array}{c} \mathrm{KNO}_{3} \\ \mathrm{MgSO}_{4} \times 7\mathrm{H_{2}O} \\ \mathrm{CaCl}_{2} \times 2\mathrm{H_{2}O} \\ \mathrm{KH}_{2}\mathrm{PO}_{4} \\ \mathrm{(NH}_{4})\mathrm{NO}_{3} \end{array}$	$\begin{array}{c} 1,9~{\rm g/l} \\ 0,37~{\rm g/l} \\ 0,44~{\rm g/l} \\ 0,17~{\rm g/l} \\ 1,65~{\rm g/l} \end{array}$	$\begin{array}{c} \mathrm{KNO}_{3} \\ \mathrm{MgSO}_{4} \times 7\mathrm{H}_{2}\mathrm{O} \\ \mathrm{CaCl}_{2} \times 2\mathrm{H}_{2}\mathrm{O} \\ \mathrm{KH}_{2}\mathrm{PO}_{4} \\ \mathrm{(NH}_{4})\mathrm{NO}_{3} \end{array}$
Mikronährelement	е	Mikronähreleme	nte
$\begin{array}{c} 1,69\mathrm{mg/l}\\ 0,62\mathrm{mg/l}\\ 0,86\mathrm{mg/l}\\ 83\mu\mathrm{g/l}\\ 25\mu\mathrm{g/l}\\ 2,5\mu\mathrm{g/l}\\ 2,5\mu\mathrm{g/l}\\ 2,5\mu\mathrm{g/l}\\ \end{array}$	$\begin{array}{c} \mathrm{MnSO_4}\times\mathrm{H_2O}\\ \mathrm{H_3BO_3}\\ \mathrm{ZnSO_4}\times7\mathrm{H_2O}\\ \mathrm{KI}\\ \mathrm{Na_2MoO_4}\times2\mathrm{H_2O}\\ \mathrm{CuSO_4}\times5\mathrm{H_2O}\\ \mathrm{CoCl_2}\times6\mathrm{H_2O} \end{array}$	$\begin{array}{r} 1,69~{\rm mg/l}\\ 0,62~{\rm mg/l}\\ 0,86~{\rm mg/l}\\ 83\mu{\rm g/l}\\ 25\mu{\rm g/l}\\ 2,5\mu{\rm g/l}\\ 2,5\mu{\rm g/l}\\ 2,5\mu{\rm g/l}\\ 2,5\mu{\rm g/l} \end{array}$	$\begin{array}{c} \mathrm{MnSO_4}\times\mathrm{H_2O}\\ \mathrm{H_3BO_3}\\ \mathrm{ZnSO_4}\times7\mathrm{H_2O}\\ \mathrm{KI}\\ \mathrm{Na_2MoO_4}\times2\mathrm{H_2O}\\ \mathrm{CuSO_4}\times5\mathrm{H_2O}\\ \mathrm{CoCl_2}\times6\mathrm{H_2O} \end{array}$
$\begin{array}{c} 0,05 \ \% \\ 30 \ {\rm g/l} \\ {\rm pH} \ 5,8 \\ 6 \ {\rm g/l} \end{array}$	FeNaEDTA Saccharose Agar	0,05 % 30 g/l 1 mg/l 1 mg/l 1 mg/l 100 mg/l pH 5,8 6 g/l	FeNaEDTA Saccharose Thiamin-HCl BAP NAA Myo-Inositol Agar

Tabelle 2.2: Zusammensetzung RM-Medium

Tabelle 2.3: Zusammensetzung RMOP-Medium

Als Pflanzenmaterial zur Transformation wurde steriles Blattmaterial von *N. tabacum* cv. Petit Havanna gewählt, das in Sterilkultur (Tab. 2.4) angezogen wurde.

Die Transformation des pflanzlichen Blattmaterials wurde mit Hilfe der biolistischen Methode durchgeführt. Hierbei werden DNA-beschichtete Goldpartikel (BioRad, USA) in einer Partikelkanone (PDS-100/He, BioRad) stark beschleunigt, wodurch sie die Zellwand der ersten Zellschichten des Blattmaterials durchschlagen können.

Zur Vorbereitung dieses Schritts wurden 1,4 mg Goldpartikel (Korngröße  $0,6 \,\mu\text{m}$ ) je Schuss mit 20  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA durch Mischen und Inkubation mit CaCl<sub>2</sub> und Spermidin beschichtet. Hierbei wurde eine Beschichtung der Goldpartikel durch Präzipitation der DNA mit Ethanol auf die Partikel erreicht.
Zum Beschuss wurde eine Petrischale mit agarverfestigtem RM-Medium vollständig mit Blättern mit der abaxialen Seite nach oben ausgelegt. Mit Hilfe der Partikelkanone wurden die beschichteten Goldpartikel mit einem Druck von 75,8 bar (1100 psi *rupture disk*, Bio-Rad) beschleunigt. Anschließend wurden das beschossene Blattmaterial in  $5 \times 5$  mm große Stücke zerschnitten und auf Selektionsmedium, RMOP (Svab *et al.*, 1990) mit 500 mg/l Spectinomycin, ausgelegt. Zellen, die transformierte Plastiden enthielten, überlebten auf diesem Medium und wurden durch die zugesetzten Hormone und deren Verhältnis zueinander zur Zellteilung und Callusbildung oder zur direkten Sprossregeneration angeregt.

Nach erfolgter Bildung von Callusmaterial kam es zur Regeneration von Sprossmaterial. Dieses war mit hoher Wahrscheinlichkeit kein homoplasmatisches Gewebe und wurde aus diesem Grund weiteren Regenerationsrunden unterzogen. Die Regenerationsversuche wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt, wobei *Growbanks* (CLF Laborgeräte, Emersacker) genutzt wurden und mit den in Tabelle 2.4 beschriebenen Einstellungen betrieben wurden.

Regenerierte Pflanzen konnten ins Glasgewächshaus ausgebracht (Kap. 2.7.1) und bis zur Samenreife kultiviert werden. Gelegentlich auftretende männliche Sterilität wurde durch manuelle Bestäubung mit Wildtyp-Pollen kompensiert.

Zur Bestätigung der Homoplasmie wurde das erzeugte Saatgut auf RM-Platten mit 500 mg/l Spectinomycin und RM-Platten mit 500 mg/l Spectinomycin und Streptomycin ausgebracht. Nach erfolgter Keimung des Saatguts wurde der Homoplasmiestatus an Hand des Vorhandenseins weißlicher Keimlinge bewertet. Traten diese vereinzelt auf, war zu folgern, dass die Mutterpflanze einen heteroplasmatischen Genotyp bezüglich des *aa-dA*-Gens aufwies. Eine homogene Population an Keimlingen wurde als Bestätigung der Homoplasmie der Mutterpflanze interpretiert. Da mit Hilfe der Samentests eine begrenzte Aussage über die Homoplasmie des vollständigen Konstrukts getroffen werden konnte, wurden gleichzeitig Southern Blots (Kap. 2.9) mit DNA-Isolaten der Mutterpflanzen durchgeführt.

#### 2.6.2 Transformation von E. coli

Die Transformation von *E. coli* mit Hilfe der Hitzeschockmethode ist mechanistisch nicht vollständig geklärt, wird jedoch standardmäßig verwendet.

Zur Transformation wurden 200  $\mu$ l kompetenter TOP10F'–Zellen (Invitrogen) genutzt, die nach einer Rubidiumchloridmethode (Mülhardt, 2000) hergestellt wurden. Diese wurden mit 5 $\mu$ l eines Ligationsansatzes (Kap. 2.5) versetzt und 15 min auf Eis inkubiert. 15 s bei 42 °C führten zur Transformation mittels Hitzeschock. Anschließend wurden die Zellen auf Eis abgekühlt. Auf eine einstündige Inkubation bei 37 °C folgte die Ausbringung des Gemisches aus transformierten und untransformierten Zellen auf Selektionsmedium (LB versetzt mit 1,25 % Agar und 50  $\mu$ g/ml Ampicillin). Die auf dem verfestigten Medium als Kolonien gewachsenen Zellen konnten anschließend als Ausgangspunkt für Proteini-

solationen (Kap. 2.8.3) oder zur Gewinnung von DNA- und RNA-Proben (Kap. 2.8.1, Kap. 2.8.2) genutzt werden.

#### 2.7 Kulturbedingungen

#### 2.7.1 Wachstumsbedingungen für Tabak

Tabelle 2.4: Kulturbedingungen für Tabak während der Sterilkultur

Lichtintensität	und	-	$50-55 \ \mu mol * s^{-1} * m^{-2}, \ 16 \ h$
dauer			
Temperatur			$25^{\circ}\mathrm{C}/20^{\circ}\mathrm{C}$
Tag/Nacht			

Tabelle 2.5: Kulturbedingungen für Tabak im Phytotron

Lichtintensität und	1 -	$120 \ \mu mol * s^{-1} * m^{-2}, \ 16 \ h$
dauer		
Temperatur		$20^{\circ}\mathrm{C}/18^{\circ}\mathrm{C}$
$\mathrm{Tag}/\mathrm{Nacht}$		
Luftfeuchte		70~%

Tabelle 2.6: Kulturbedingungen für Tabak im Glasgewächshaus

Lichtdauer	16 h
Temperatur	$25^{\circ}\mathrm{C}/20^{\circ}\mathrm{C}$
$\mathrm{Tag/Nacht}$	
Luftfeuchte	55~%

Tabaksamen wurden direkt auf Erde ausgelegt. Nach Keimung und Vorkultur in einem Phytotron (Tab. 2.5) für zwei Wochen wurden die Pflanzen pikiert und ins Glasgewächshaus transferiert. Die Kultur der Tabakpflanzen im Glasgewächshaus erfolgte unter den in Tabelle 2.6 angegebenen Bedingungen.

Die Kultur erfolgte in drei biologischen Replikaten in randomisierter Aufstellung im Gewächshaus. Nach sechswöchigem Wachstum wurde das jüngste vollständig entwickelte Blatt komplett geerntet und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Die Kultur für die Transformanden pOD 1 bis pOD 15 und pOD 17 bis pOD 21 erfolgte aus zeitlichen Gründen separat. In beide Versuche wurden Wildtyppflanzen sowie die Transformanden S5 (Bock *et al.*, 1994) und pOD 1 als Kontrollen integriert.

#### 2.7.2 Wachstumsbedingungen für E. coli

Transformierte *E. coli* TOP10F' (Invitrogen) wurden bei 37°C in YT-Medium (Sambrook und Russell, 2001) über Nacht unter Schütteln kultiviert. Die Kultur mit sehr hoher Zelldichte wurde anschließend 1:50 verdünnt und bei gleichen Bedingungen bis zu einer optischen Dichte von 0,6 bis 0,7 bei 37°C kultiviert. Die Isolation der kultivierten Zellen erfolgte durch Zentrifugation bei 4°C und 3000 g. Alle weiteren Arbeitsschritte der Ernte erfolgten auf Eis.

Nach Entfernung des Mediums konnten die abzentrifugierten Zellen in flüssigem Stickstoff eingefroren werden.

Zur Vorbereitung der Proteinisolation (Kap. 2.8.3) wurde 1 ml Kultur und zur Materialgewinnung für eine RNA-Isolation (Kap. 2.8.2) 10 ml genutzt.

Für DNA-Isolationen konnte 1 ml der Übernacht-Kultur genutzt werden.

#### 2.8 Isolation von Proteinen und Nukleinsäuren

#### 2.8.1 Isolation von DNA

#### Tabak

Die Isolation der DNA wurde angelehnt an die Methode von Doyle und Doyle (1987) durchgeführt. Für die DNA-Isolation wurden 50 mg homogenisierten Blattmaterials mit 500  $\mu$ l CTAB-Puffer versetzt. Eine Inkubation bei 60 °C für 30 min sorgte für einen Aufschluss des Gewebes. Nach Zugabe von 200  $\mu$ l Chloroform und Zentrifugation bei Raumtemperatur und 15.000 g für 10 min trennten sich unlösliche Zellbestandteile ab.

Ein weiterer Extraktionsschritt des Überstands mit 150  $\mu$ l Chloroform führte zu einer weiteren Reinigung des Isolats. Mit Zusatz von 0,8 Volumen Isopropanol erfolgte die Fällung der DNA bei Raumtemperatur. Eine Zentrifugation der Proben bei 4 °C und 15.000 g für 20 min führte zur Sedimentation der DNA. Nach erfolgtem Waschen des DNA-Sediments mit 70 % Ethanol konnte die DNA in TE-Puffer mit 100  $\mu$ g/ml RNase A-Zusatz gelöst und weiteren Analysen (z.B. 2.9) zugeführt werden

#### E. coli

Die Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde nach der Methode der alkalischen Lyse, wie in Sambrook und Russell (2001) beschrieben (nach Birnboim und Doly (1979)), durchgeführt. Hierbei wurden die Zellen von 1 ml einer Kultur, die über Nacht bei 37°C angezogen wurde, bei 3.000 g und 4°C für 5 min sedimentiert. Dieses Sediment wurde in einem isoosmotischen Puffer (Lösung I) aufgenommen und anschließend die Zellen in einer alkalischen SDS-haltigen Lösung (Lösung II) aufgeschlossen. Neutralisation (Lösung III) und Abzentrifugation unlöslicher Bestandteile, wie ausgefällter genomischer DNA und Proteine, resultierte in Plasmid–DNA angereichertem Überstand. Dieser Überstand wurde mit 1 Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) von kontaminierenden Proteinen gereinigt. Zentrifugation bei 10.000 g für 5 min führte zu einer Ansammlung der kontaminierenden Proteine an der Interphase. Mit 0,8 Volumen Isopropanol konnte die Plasmid–DNA aus dem Überstand präzipitiert und durch Zentrifugation bei 13.000 g sedimentiert werden. Das Sediment konnte nach anschließender Lufttrocknung in TE-Puffer, versetzt mit 100  $\mu$ g/ml RNase A, aufgenommen werden.

#### Chloroplasten

Die Isolation von DNA aus Plastiden erfolgte nach Metzlaff (1983). Bei der Isolation der Plastiden war zu beachten, dass die plastidäre DNA durch Proteine an die Membransysteme des Plastiden gebunden ist. Eine schnelle Auflösung der Membransysteme während der Isolation konnte so zu einer Fragmentierung der DNA führen. Einen unvollständigen Aufschluss der Membransysteme galt es im Sinne einer möglichst vollständigen DNA-Isolation zu vermeiden.

Zur Isolation der plastidären DNA wurde ein Chloroplastenlysepuffer genutzt, in dem die Plastiden aufgenommen wurden. Sorgfältiges Mischen und eine anschließende Inkubation auf Eis für 5 min führte zu einer Lyse der Chloroplasten. Die Lösung wurde anschließend mit 1 Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt und vollständig gemischt. Die Phasentrennung der Emulsion wurde durch Zentrifugation bei 1500 g und 4 °C für 5 min beschleunigt. Der Überstand wurde anschließend mit 0,1 Volumen Na-Acetat pH 4,8 und 0,8 Volumen Isopropanol versetzt. Eine Inkubation auf Eis beschleunigte die Fällungsreaktion. Die ausgefällte DNA wurde bei 15000 g sedimentiert. Das noch mit Salzen kontaminierte Sediment wurde anschließend mit 70 % Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation und Trocknung des Sediments konnte die DNA in 25  $\mu$ l TE-Puffer (100  $\mu$ g/ml RNase A) aufgenommen werden.

#### 2.8.2 Isolation von RNA

#### Tabak

Die Isolation von RNA aus Pflanzenmaterial wurde mit Hilfe von TriFast (PeqLab) nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Für einige Proben war es jedoch nicht möglich, mit dieser Methode intakte RNA in ausreichender Reinheit zu isolieren. Kontaminierende Salze und Proteine führten zu einer schlechten Löslichkeit des Sediments und uneinheitlichem Laufverhalten in denaturierenden Agarosegelen.

Als Alternative diente ein Protokoll nach Verwoerd et al. (1989).

Bei dieser Methode wurden ca. 200 mg homogenisierten Pflanzenmaterials (Kap. 2.7.1) in 1 ml auf 80 °C vorgewärmten RNA-Extraktionspuffer aufgenommen. Eine anschließende Zugabe von 400  $\mu$ l Chloroform führte zu einer Phasentrennung während der Zentrifugation bei 4 °C und 15.000 g für 15 min. Der Überstand wurde entfernt, im Verhältnis 1:1 mit 4 M

LiCl versetzt und auf Eis über Nacht inkubiert. Unter diesen Bedingungen fiel RNA aus der Lösung aus und ließ sich durch Zentrifugation bei 4 °C und 20.000 g für 30 min sedimentieren. Nach Waschen mit 70 % Ethanol konnte das Sediment in DEPC-behandeltem Wasser gelöst werden.

#### E. coli

Die Isolation von RNA aus *E. coli* erfordert große Sorgfalt, da die große Anzahl an RNasen und die geringe Stabilität der RNA zu einer schnellen Degradation führen können. Die in flüssigem Stickstoff gelagerten Proben aus Kap. 2.7.2 wurden mit 1 ml auf 80 °C vortemperierten RNA-Extraktionspuffer versetzt und durch heftiges Pipettieren gemischt. Mit Hilfe anschließender Zentrifugationsschritte und Fällung mit 4 M LiCl konnte, wie bei der Isolation von RNA aus pflanzlichem Material, gereinigte RNA gewonnen werden.

#### 2.8.3 Isolation von Protein

#### Tabak

Die Proteinisolation aus pflanzlichem Material wurde nach Kuroda und Maliga (2001) durchgeführt. Ca. 50 mg homogenisierten Blattmaterials wurden in stickstoffgekühltem Zustand mit 500  $\mu$ l Proteinisolationspuffer I versetzt. Durch heftiges Mixen konnte das Material mit dem eiskalten Proteinisolationspuffer I gemischt werden. Das Gemisch wurde anschließend 5 min auf Eis inkubiert. Eine Zentrifugation bei 4 °C und 20.000 g für 5 min trennte unlösliche Bestandteile der Probe ab. Der Überstand wurde zur Proteinbestimmung (Kap. 2.10) und zum Nachweis des GFPs (Kap. 2.11) genutzt.

#### E. coli

Das stickstoffgefrorene Sediment aus der Kultur von *E. coli* (Kap. 2.7.2) wurde mit 500  $\mu$ l Proteinisolationspuffer II versetzt und durch Pipettieren sorgfältig gemischt. Die Suspension wurde auf Eis gelagert und die Zellen mit Ultraschall im Sonifier W-250D 15 s bei 5 % Amplitude aufgeschlossen. Eine Zentrifugation bei 4 °C und 20.000 g für 5 min trennte unlösliche Zellbestandteile ab. Der Überstand konnte anschließend der Proteinbestimmung (Kap. 2.10) und dem Nachweis des GFPs (Kap. 2.11) zugeführt werden.

#### 2.9 Nachweis von Nukleinsäuren

Die Transformation des Chloroplastengenoms (Kap. 2.6.1) resultierte in der Einführung eines Restriktionslängenpolymorphismus. Die Integration des DNA-Konstrukts führte zu einer Verlängerung eines *Bgl*II-Restriktionsfragments des Plastidengenoms. Auf Grund der komplexen Mischung verschiedener DNA-Fragmente nach Verdau der isolierten DNA (Kap. 2.8.1) war es notwendig dieses Fragment spezifisch nachzuweisen. Dies erfolgte mit Hilfe von Southern Blots (Sambrook und Russell, 2001).

Zum Nachweis der Transkripte des gfp und der 16S rRNA wurden Northern Blots (Sambrook und Russell, 2001) durchgeführt.

Diese Blot-Techniken dienen dazu, mittels radioaktiv markierter Sonden geringste Mengen an Nukleinsäurefragmenten zu detektieren.

Die Proben, die das nachzuweisende DNA- oder RNA-Fragment enthielt, wurden in einem 1% bzw. einem 1% denaturierenden Agarosegel (Sambrook und Russell, 2001) aufgetrennt. Mit Hilfe eines Kapillarblots wurde das aufgetrennte Nukleinsäuregemisch auf eine Nylon-Membran (HyBond-XL, GE Healthcare) übertragen. Zur Detektion des gesuchten Nukleinsäurefragments wurde ein einzelsträngiges radioaktiv markiertes DNA-Fragment als Sonde benötigt. Zur Vorbereitung der Sonde wurde ein Fragment plastidärer DNA mit Hilfe von PCR amplifiziert. Hierzu wurden folgende Oligonukleotide eingesetzt:

Sonde	5' Oligonukleotid	3' Oligonukleotid
16 S rRNA	P16Srrn-F	P16Srrn-R
GFP	PZF9	PZF10
psaB	P7247	P7244

Die Sonden wurden mit Hilfe der PCR-Amplifikate und des Megaprime Kits (GE Healthcare) hergestellt, wobei das Herstellerprotokoll eingehalten wurde.

Die Markierungsreaktion basiert auf der Nutzung des Klenow-Fragments der *E. coli*-DNA-Polymerase, das 5'-3' Polymerase- und 3'-5' Exonukleaseaktivität zeigt. Nach Denaturierung der PCR-Amplifikate und Anlagerung von Oligonukleotiden zufälliger Sequenz an diese DNA, konnte die Polymeraseaktivität genutzt werden, um bei 37 °C einen komplementären DNA Strang aufzubauen. Das vorliegende  $[\alpha^{32}P]$ dCTP im dNTP Gemisch führte zu einer radioaktiven Markierung dieses Strangs. Anschließende Denaturierung der doppelsträngigen DNA und schnelles Abkühlen des Gemisches führte zu einem einzelsträngigen Sondengemisch aus radioaktiv markierter und nicht-radioaktiver DNA.

Die Membran mit transferierter DNA oder RNA wurde in Church-Puffer auf Hybridisierungstemperatur von 55 °C gebracht und das Sondengemisch zugesetzt. Nach Hybridisierung von 2h bis 4h konnte überflüssige und unspezifisch gebundene Sonde von der Membran mit Waschpuffer II entfernt werden. Die Abbildung des Hybridisierungsmusters erfolgte mit Hilfe einer Exposition auf *Phosphorscreens* (GE Healthcare), welche mit Hilfe des Laserscanners Typhoon (GE Healthcare) ausgelesen wurden.

#### 2.10 Proteinbestimmung

#### 2.10.1 BCA-Nachweis

Der Bichinonsäurenachweis basiert auf einer Reduktion von Kupferionen in Abhängigkeit von anwesenden Aminosäuren (Tryptophan, Tyrosin, Cystein). Anschließend chelieren das reduzierte Kupferion zwei Bichinonsäuremoleküle und bilden dabei einen stark bei 562 nm absorbierenden Komplex. Die Menge an gebildetem Kupfer(I)ionen korreliert mit der Stoffmenge der in Lösung befindlichen Proteine.

Als Reagenz kam ein BCA-Reaktionskit zum Einsatz. Es wurde nach Herstellerprotokoll angewendet.

Da der BCA-Nachweis tolerant gegenüber SDS in Lösung ist, konnte dieser Nachweis für Proteinisolate aus *E. coli* eingesetzt werden. Hierfür wurde eine Kalibrationsreihe mit BSA in Konzentrationen von  $5 \,\mu$ g/ml bis 1,5 mg/ml in Proteinisolationspuffer II erstellt.  $5 \,\mu$ l Isolat (Kap. 2.8.3) bzw.  $25 \,\mu$ l Kalibrationslösung wurden mit 1 ml BCA-Reagenz vermischt, 30 min bei 37 °C inkubiert und anschließend bei 562 nm photometrisch vermessen. Der Proteingehalt konnte anschließend mit Hilfe der Kalibrationsreihe errechnet werden.

#### 2.10.2 Proteinnachweis nach Bradford (1976)

Dieser Nachweis beruht auf der Anfärbung von Proteinen durch den Farbstoff Coomassie. Es werden vorrangig basische Aminosäuren durch Coomassie G250 gebunden. Zur Durchführung der Proteinfärbung nach Bradford (1976) kam ein vorbereitetes 5 × Konzentrat (RotiQuant, Roth) zum Einsatz, das nach Herstellerprotokoll angewendet wurde.

Da der BCA-Nachweis eine hohe Empfindlichkeit gegenüber reduzierenden Substanzen wie DTT zeigt, das im Proteinisolationspuffer I enthalten ist, wurde der Nachweis nach Bradford für die Bestimmung der Proteinkonzentration von Isolaten aus *N. tabacum* genutzt. Als Voraussetzung dient eine in Proteinisolationspuffer I erstellte Kalibrationsreihe mit Konzentrationen von  $5 \mu \text{g/ml}$  bis 1,5 mg/ml BSA als Standardprotein.  $5 \mu$ l Isolat (Kap. 2.8.3) bzw. 50  $\mu$ l Kalibrationslösung wurden mit 1 ml 1 × Bradford-Reagenz versetzt und photometrisch bei 595 nm vermessen. Über die als Referenz dienende Kalibrationsreihe konnten Rückschlüsse auf den Proteingehalt der Probe gezogen werden.

#### 2.11 Nachweis von Proteinen

#### 2.11.1 Proteingelelektrophorese in Tris/Tricin-Gelen

	15%	20~%	Sammelgel
Acrylamid Gel 40 (29:1)	$7,5~\mathrm{ml}$	$10\mathrm{ml}$	$2\mathrm{ml}$
Glycerol	$1,\!26\mathrm{g}$	$4,2~{ m g}$	
Gelpuffer	$6,\!66\mathrm{ml}$	$6,\!66\mathrm{ml}$	$6,\!66\mathrm{ml}$
Wasser	$4,9\mathrm{ml}$	$1,1~{ m ml}$	$11,3\mathrm{ml}$
10~% APS	$40\mu l$	$40\mu l$	$200\mu\mathrm{l}$
TEMED	$10\mu { m l}$	$10\mu\mathrm{l}$	$20\mu\mathrm{l}$

Tabelle 2.7: Zusammensetzung des Tris/Tricin-Gels

Tris/Tricin-Gele beruhen auf einem Gelsystem, das in Schaegger und von Jagow (1987) beschrieben wurde. Es zeichnet sich durch hohe Trennschärfe aus.

In dieser Arbeit wurden lineare Gradientengele genutzt, die einen Konzentrationsbereich von  $15\,\%$  bis 20 % abdeckten.

Die Gelmischungen wurden nach der genannten Rezeptur (Tab. 2.11.1) hergestellt und mit Hilfe eines Gradientenmischers (ltf Labortechnik, Wasserburg) wurde ein lineares Gradientengel von 15 % bis 20 % geschichtet. Nach abgeschlossener Polymerisation konnte die Gelmischung für ein Sammelgel aufgeschichtet werden, in das ein Probenkamm eingefügt wurde. Dieser konnte entfernt werden, sobald das Sammelgel auspolymerisiert war. In die Taschen konnten dann bei 95 °C für 3 min denaturierte Proteinproben eingefüllt werden, die mit 0,3 Volumen 3 × Ladepuffer versetzt waren. Die eingesetzten Proteinmengen variierten zwischen 15  $\mu$ g und 25 ng.

#### 2.11.2 Proteingelelektrophorese in Tris/Glycin-Gelen

	Sammelgel (4 % T, 3 % C)	Trenngel (15 $\%$ T, 3 $\%$ C)
Rotiphorese Gel A	$1,94\mathrm{ml}$	$24,\!35\mathrm{ml}$
Rotiphorese Gel B	$0.9\mathrm{ml}$	$9,75~\mathrm{ml}$
Sammelgel-, Trenngelpuffer	$3,75\mathrm{ml}$	$12,5~\mathrm{ml}$
$10\%~{ m SDS}$	$150\mu\mathrm{l}$	$0,5~\mathrm{ml}$
Wasser	$8,1\mathrm{ml}$	$2,7\mathrm{ml}$
$10\% \mathrm{~APS}$	$150\mu\mathrm{l}$	$200\mu\mathrm{l}$
TEMED	$15\mu\mathrm{l}$	$20\mu\mathrm{l}$

Tabelle 2.8: Zusammensetzung des Tris/Glycin-Gels

Die Proteingeleektrophorese in Tris/Glycin-Gelen (Laemmli, 1970) zeichnet sich durch gute Auflösung aus, wobei keine Schichtung linearer Gradienten anfällt. Die Auflösung ist der von Tris/Tricin-Gelen jedoch unterlegen. Auf Grund des geringeren Zeitaufwands bei der Herstellung der Gele, wurden diese zur Überprüfung der Integrität der Proteinisolate genutzt. Die Herstellung des Gels erfolgt analog zur Herstellung der Tris/Tricin-Gele (Kap. 2.7). Die Proteinisolate wurden ebenfalls bei 95 °C für 3 min denaturiert, nachdem 0,2 Volumen 6 × Ladepuffer zugesetzt wurde. Es wurden jeweils 10  $\mu$ g löslichen Gesamtproteins auf das Gel aufgetragen.

#### 2.11.3 Western Blot

Der Nachweis des GFP-Proteins wurde mit Hilfe von Western Blots und anschließender Immundetektion nach Towbin *et al.* (1979) durchgeführt.

Beim Western Blot werden Proteine aus einem Polyacrylamidgel (Kap. 2.7) auf eine hydrophobe Membran übertragen. Anschließend können Proteine spezifisch mit Hilfe von Antikörpern und einer Färbereaktion nachgewiesen werden.

Der Western Blot wurde im *Semidry*-Verfahren durchgeführt. In dieser Arbeit wurde eine "Semidry" Blot Aperatur (Bio–Rad) verwendet. Bei 3 mA/cm<sup>2</sup> für 90 min wurden alle Proteine auf eine PVDF–Membran (Hybond P), die nach Herstellerangaben mit Methanol und anschließender Inkubation mit Transferpuffer aktiviert wurde, übertragen.

#### 2.11.4 Immundetektion von Proteinen

Proteine, die auf eine Membran mit Hilfe des Western Blots übertragen wurden (Kap. 2.11.3), können mit spezifischen Antikörpern auf dieser nachgewiesen werden.

Um freie Bindungsstellen auf der Membran abzusättigen, wurde die Membran (aus Kap. 2.11.3) 30 min mit 0,5 % BSA Lösung inkubiert. Anschließend konnte das GFP spezifisch mit einem Maus-anti-GFP-Antikörper (Clontech) nachgewiesen werden. Dieser kam in einer Verdünnung von 1:5000 zum Einsatz. Nach erfolgter Inkubation für 1 h wurde überschüssiger Antikörper durch Waschen mit TBS-T von der Membran entfernt. Darauf folgend konnte dieser Antikörper mit Hilfe eines zweiten Antikörpers nachgewiesen werden, der an eine Meerrettichperoxidase gebunden ist. Diese wurde mittels eines Chemolumineszenz-Kits (ECL Plus) nachgewiesen. Zur Detektion des ausgesandten Lichts wurden Röntgenfilme (Kodak BioMax XAR Film) genutzt.

#### 2.12 Quantifizierung von RNA- und Proteingehalten

Die Quantifizierung der Signalintensität der Northern Blots (Kap. 2.9) bzw. die Schwärzung der Röntgenfilme aus Kap. 2.11.4 konnte mit Hilfe der ImageQuant Software (GE Healthcare) durchgeführt werden. Hierfür wurden die Dateien geladen, die zu quantifizierenden Bereiche ausgewählt und eine automatische Quantifizierung durchgeführt. Als Hintergrundkorrektur kam die Methode "Object Average" zur Verwendung, wofür ein weiterer Quantifizierungsbereich in den Hintergrund der Abbildung gelegt wurde.

#### 2.13 Polysomenisolation

Die Polysomenisolation dient zur Aufklärung der Menge an aktiv translatierter RNA. Hierfür wird RNA unter nativen Bedingungen unter Anwesenheit von Translationsinhibitoren – Cycloheximid und Chloramphenicol – isoliert, um zu gewährleisten, dass vor der Ernte initiierte Ribosomen nicht von der mRNA dissoziieren. Die Isolation wurde angelehnt an Barkan (1993) durchgeführt.

Ca. 200 mg stickstoffgekühlten homogenisierten Blattmaterials aus Kap. 2.7.1 wurden mit 1,5 ml Polysomenisolationspuffer versetzt und sorgfältig gemischt. Eine Zentrifugation bei 13000 g und 4 °C für 5 min trennte unlösliche Zellbestandteile ab.

Ein Aliquot des Gemisches wurde einer Puromycinbehandlung (Blobel und Sabatini, 1971)

unterzogen, die die Ribosomen von der RNA ablöst. Hierfür wurde in diesem Aliquot eine KCl-Konzentration von 0,5 M eingestellt. Nachfolgend fand bei einer Puromycinkonzentration von 0,5 mg/ml und 37 °C für 10 min die Dissoziation der Ribosomen von der mRNA statt. Anschließend erfolgte eine Zugabe von EDTA zur Einstellung einer Konzentration von 20 mM. Die daraus folgende Absenkung der Konzentration freier Magnesiumionen förderte eine weitere Dissoziation der Ribosomen.

In allen Aliquots wurden restliche Mikrosomen mit Hilfe einer Zugabe von 1/20 Volumen 10 % Desoxycholat 5 min auf Eis solubilisiert. Eine nachfolgende Zentrifugation bei 13000 g und 4 °C für 15 min sedimentierte letzte feste Bestandteile des Probenmaterials.

 $500 \ \mu$ l der Probe oder Puromycinkontrolle wurden auf einen linearen Saccharosegradienten 15 %-56 % aufgetragen und bei 200000 g und 4 °C für 90 min zentrifugiert. Der Gradient wurde anschließend mit Hilfe eines Fraktionssammlers in 10 Fraktionen geteilt.

Die Aufarbeitung der einzelnen Fraktionen erfolgte nach Verdünnung der Proben mit 0,7 Volumen Wasser und Versetzen mit EDTA und SDS bis zu einer Konzentration von 20 mM bzw. 0,5 %. Die Entfernung von Proteinen aus den Proben erfolgte durch Zugabe von 1 Volumen Phenol–Chloroform–Isoamylalkohol–Gemisch (Roti P/C/I, Roth) und Zentrifugation bei 10000 g und 4 °C für 5 min. Der Überstand wurde mit 1 Volumen 4 M LiCl versetzt und bei 4 °C über Nacht inkubiert, um eine Fällung der RNA zu erreichen. Zentrifugation bei 4 °C und 20.000 g für 30 min sedimentiert die RNA. Nach Waschen mit 70 % Ethanol kann das Sediment in DEPC-behandeltem Wasser gelöst werden.

 $7,5 \,\mu$ l jeder Fraktion wurden auf denaturierende Agarosegele aufgetragen und die Menge an Transkript mit Hilfe von Northern Blots (2.9) bestimmt.

#### 2.14 Chloroplastenisolation

Tabelle 2.9: Kultu	rbedingungen für <i>Pelargor</i>	<i>nium zonale</i> im	Glasgewächshaus
	Lichtdauer	$16\mathrm{h}$	
	Temperatur Tag/Nacht	$22^{\circ}\mathrm{C}/20^{\circ}\mathrm{C}$	
	Luftfeuchte	50~%	

Die Chloroplastenisolation wurde angelehnt an die Arbeiten von M. Metzlaff (Metzlaff, 1980; 1983)) durchgeführt.

Die Isolation von Chloroplasten aus *Pelargonium zonale* erfolgte aus Pflanzen, die zwischen drei und fünf Monaten im Gewächshaus kultiviert (Tab. 2.9) wurden. In Vorbereitung der Isolation wurden die Pflanzen einen Tag dunkel gestellt. Der geringere Stärkeanteil der Blätter führte zu einem erhöhten Anteil intakter Plastiden im Isolat.

Zur Isolation wurden 75-100 g jungen Blattmaterials eingesetzt. Dieses wurde in einem Waring Blender (Waring Commercial, USA) mit vier Pulsen je 5 s ( $2 \times$  Stufe "high",  $2 \times$  Stufe "low") in Puffer A homogenisiert. Eine Filtration durch Verbandmull und Miracloth (Calbiochem, USA) trennte nur grob zerkleinertes Blattmaterial ab. Das Filtrat wurde

anschließend bei 3000 g und 4 °C für 1 min zentrifugiert, um die Chloroplasten zu sedimentieren. Zur Steigerung der Ausbeute konnte der Überstand nochmals mit 6000 g zentrifugiert werden. Nach Waschen mit Puffer B wurde diese Fraktion direkt für weitere Untersuchungen genutzt. Der Anteil intakter Plastiden war in dieser Fraktion sehr gering. Das 3000 g-Sediment enthielt noch eine Vielzahl weiterer Zellbestandteile wie Zellkerne und Mitochondrien. Diese wurden mit Hilfe eines Saccharosegradienten (30 %-45 %-60 %) abgetrennt. Hierzu wurde das Sediment in Puffer B aufgenommen und auf den Saccharosegradienten aufgetragen. Eine Zentrifugation bei 6000 g und 4 °C für 20 min führte zu einer Auftrennung des Gemisches im Gradienten. Intakte Chloroplasten sammelten sich an der Grenzschicht zwischen 45 %-60 % und beschädigte Chloroplasten an der Grenzschicht zwischen 30 %-45 %. Die Plastiden wurden aus diesen Grenzschichten vorsichtig abgesaugt und konnten für weitere Versuche genutzt werden.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Klonierung von Shine-Dalgarno-Sequenz-Konstrukten

Im Rahmen dieser Arbeit wurden diverse Shine-Dalgarno-Sequenz (SD-Sequenz)-Varianten untersucht, um den Einfluss dieser Sequenz auf die Translation in *Escherichia coli* und Plastiden von *Nicotiana tabacum* zu untersuchen. Hierzu wurde die 5' UTR des Gens 10 des T7 Phagen (Ye *et al.*, 2001) als Basis genutzt und durch Einführung weiterer SD-Sequenzen modifiziert. Mit Hilfe der Konstrukte sollten verschiedene Fragestellungen bearbeitet werden.

Stellt die SD-Sequenz eine eineindeutige Ribosomenbindestelle dar? Um diese Frage zu beantworten wurden vier Konstrukte (Abb. 3.1) entworfen, die mit zwei (pOD 2 und pOD 6) oder drei (pOD 3 und pOD 7) SD-Sequenzen eine Vervielfältigung von potentiellen Ribosomenbindestellen zur Verfügung stellten. Die Konstrukte pOD 6 und 7 enthielten simpel aneinandergereihte SD-Sequenzen, um die Anzahl potentieller Bindestellen zu erhöhen. Ribosomen decken ca. 35nt der gebundenen mRNA ab (Borisova *et al.*, 1979; Steitz, 1969). Durch eine potentielle Bindung mehrerer Ribosomen gleichzeitig an der 5'UTR sollte eine Steigerung der Ribosomenkonzentration an der mRNA erreicht werden. Hierdurch könnte sich eine potentielle Steigerung der Translationsinitiation ergeben. Hierfür wurden in pOD 2 und 3 (Abb. 3.1) SD-Sequenzen mit einem Abstand von 39 nt zueinander eingefügt.

Im Gegensatz zu den vorgenannten Konstrukten enthielten alle weiteren Konstrukte eine oder mehrere Translationsinitiationsstellen. Diese bestanden aus einer SD-Sequenz als Ribosomenbindestelle und einem Startcodon im Abstand von 8 nt (Kozak, 1983; Chen *et al.*, 1994). Im weiteren Verlauf der Beschreibung dieser Arbeit wird somit zwischen Ribosomenbindestellen und Translationsinitiationsstellen unterschieden (Kozak, 1983; Vellanoweth und Rabinowitz, 1992).

Entsprechend wurden zwei weitere Konstruktserien zur Untersuchung des Einflusses des Status des Ribosoms hergestellt. Hierzu wurden Konstrukte mit kleinen ORF (offenes Leseraster) in der 5'UTR erzeugt. Hier wurde ebenfalls das Muster der Verdopplung und Verdreifachung zur Steigerung der potentiellen Bindestellen angewandt. Die Konstrukte pOD 4 und 5 enthielten zwei bzw. drei ORFs mit Startcodon und gleich darauf folgendem Stopcodon (Abb. 3.1). Hierbei sollten Ribosomen einen Initiationskomplex



Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der Shine-Dalgarno-Sequenz-Konstrukte. Angegeben sind die SD-Sequenzen (SD), Peptidase Schnittstelle (TEV), ein Teil des ribosomalen RNA Operon-Promotors (Prrn) und des gfp Gens. "//" stellt eine Aussparung von 27 nt dar. pOD19 enthält im Gegensatz zu pOD1 keine Stopcodons in dieser Region und diente als Basis für pOD20 und 21.

bilden. Anschließend besteht die Chance die nächste Translationsinitiationsstelle zu erkennen oder am Reportergen in einen Elongationskomplex überzugehen. Die Konstrukte pOD 8 und 9 enthielten innerhalb der ORFs ein Glycincodon, wodurch Ribosomen in einen Elongationskomplex übergehen (Marshall *et al.*, 2008). Diese Konstrukte dienten der Untersuchung, inwiefern Ribosomen als Elongationskomplex in der Lage sind, eine Reinitiation der Translation durchzuführen. Die letztgenannten Konstrukte konnten ebenfalls rudimentäre polycistronische Transkripte darstellen, da diese ebenfalls mehrere ORFs innerhalb eines Transkripts beherbergen. Die folgenden Konstruktserien enthielten ausschließlich Translationsinitiationsstellen. Untersucht werden sollte, ob eine Vervielfältigung der Translationsinitiationsstellen zu einer Verstärkung der Translation führt, indem Ribosomen an mehreren Stellen der 5' UTR die Translation initiieren konnten. Es wurde das Muster der aneinandergereihten Initiationsstellen zur einfachen Vervielfältigung der potentiellen Binde- und Initiationstellen in den Konstrukten pOD 11, 12 sowie pOD 17 und 18 umgesetzt (jeweils zwei bzw. drei Initiationsstellen; Abb. 3.1). Da Ribosomen bei der Bindung der 5'UTR einen der Teil der mRNA abdecken, wurden auch für diese Konstrukte mit Translationsinitiationsstellen in einem der Länge der durch das Ribosom verdeckten mRNA entsprechenden Abstand hergestellt und als pOD 14, 15 und pOD 20 und 21 bezeichnet. Somit war eine potentielle Erhöhung der Ribosomenkonzentration an 5'UTRs mit Translationsinitiationsstellen gewährleistet. Die Nutzung der zusätzlichen Translationsinitiationsstellen hat N-terminale Verlängerungen zur Folge, die durch den Größenunterschied des resultierenden GFP nachgewiesen werden konnte.

Eine TEV-Schnittstelle ("tobacco etch virus", Tabak-Ätzvirus) in den Konstrukten pOD 11, 12, 14 und 15 ermöglichte die Abspaltung der heterogenen N-Termini, die aus der Nutzung der verschiedenen Translationsinitiationsstellen hervor gehen. Zusammenfassend wurden folgende Konzepte beim Entwurf der Konstrukte verfolgt:

- i eine Erhöhung der Anzahl von Ribosomenbindestellen (pOD 6 und 7)
- ii Hinzufügen von Nukleotiden, um eine gleichzeitige Bindung mehrerer Ribosomen zu ermöglichen (pOD 2 und 3)
- iii (i) und (ii) mit zusätzlichen Startcodons zur Erzeugung von vollständigen Translationsinitiationsstellen (pOD 11-21)
  - a) mit Peptidaseschnittstelle (pOD 11-15)
  - b) ohne Peptidaseschnittstelle (pOD 17-21)
- iv (iii b) mit auf das Startcodon folgendem Stopcodon zur Untersuchung der Reinitiation nach erfolgter Initiation (pOD 4 und 5)
- v (iv) mit kodierendem Codon (Gly) als Mini-ORF zur Untersuchung der Reinitiation nach erfolgter Elongation (pOD 8 und 9)

Als Kontrollen dienten Konstrukte mit einer SD-Sequenz. Hierzu zählte pOD 1 mit der 5' UTR des Gens 10 des Phagen T7 (Ye *et al.*, 2001) als Kontrolle für die Konstrukte pOD 2 bis pOD 9. Für alle Konstrukte mit TEV-Schnittstelle diente pOD 13 als Kontrolle, dass die 5' UTR des Gens 10 und die kodierende Sequenz für die TEV-Peptidaseschnittstelle enthielt. Für Konstrukte ohne TEV-Schnittstelle, jedoch mit vervielfachten Translationsinitiationsstellen, diente pOD 19 als Kontrollkonstrukt. Dieses ist pOD 1 ähnlich, enthält jedoch keine Stopcodons 5' der SD-Sequenz, die in den darauf aufbauenden Konstrukten (pOD 20 und 21) zu einem Abbruch der Translation geführt hätten.

Alle genannten Konstrukte wurden als synthetische Oligonukleotide in die 5'UTR des Reportergens *gfp* eingebracht (Kap. 2.5). Anschließend konnten sie mit Hilfe des Transformationsvektors pRB 95 (Ruf *et al.*, 2001) in *E. coli* und *N. tabacum*-Plastiden eingebracht werden.

#### 3.2 Plastidentransformation von N. tabacum

Der Transformationsvektor pRB 95 enthält 5' und 3' zur multiplen Klonierungsstelle zum Plastidengenom von N. tabacum homologe Sequenzen, welche in Folge der Transformation von N. tabacum-Plastiden zu homologer Rekombination zwischen Transformationsvektor und Plastidengenom führen. Die im Rahmen dieser Arbeit in die multiple Klonierungsstelle eingebrachten Reportergenkonstrukte wurden so zusammen mit dem Selektionsmarkergen aadA in das Plastidengenom integriert.

Mit Hilfe biolistischer Transformation wurde junges Blattmaterial von *N. tabacum* cv. Petit Havanna mit den in Kapitel 3.1 beschriebenen Konstrukten transformiert (Kap. 2.6.1). Um für alle Konstrukte mindestens zwei unabhängige homoplasmatisch transplastomische Linien zu erhalten, wurden zwei bis drei Regenerationsrunden auf Selektionsmedium benötigt. Der Nachweis eines homogenen Plastidengenoms erfolgte mit Hilfe des Nachweises des in Abbildung 3.2 skizzierten Restriktionslängenpolymorphismus.

Hierfür wurde von Pflanzen der homoplasmatischen Linien Blattproben genommen. Aus diesen wurde Gesamt–DNA isoliert (Kap. 2.8.1) und diese mit dem Restriktionsenzym BglII geschnitten. Durch die Vielzahl an Schnittstellen in der genomischen DNA führt ein Verdau dieser zu keinem Bandenmuster nach Auftrennung in einem 1%igen Agarosegel. Ein Bandenmuster der plastidären DNA ist ebenfalls nicht zu erkennen, das die als "Schmier" getrennte genomische DNA überlagert. Es muss folglich das DNA-Fragment, das das eingebrachte Konstrukt enthält, mit einer spezifischen Sonde nachgewiesen werden (Kap. 2.9, Abb. 3.3). Mit der in Kap. 2.9 beschriebenen Sonde lässt sich ein BglII–Fragment nachweisen, das einen Teil des psaB–Gens und die genomische Region bis zum Gen psbZ enthält. Dieses Fragment erfährt durch Integration des jeweiligen pOD–Konstrukts inklusive dem Selektionsmarkergen aadA eine Vergrößerung um ca. 2,4 kb (Abb. 3.2, 3.3).

Mit Hilfe von Samentests auf Selektionsmedium (Kap. 2.6.1) konnte die Homoplasmie des transformierten Plastidengenoms bestätigt werden. Homoplasmatisch transplastomische Mutterpflanzen brachten eine homogene F<sub>1</sub>-Population hervor, deren Keimlinge auf Selektionsmedium vollständig gegen das enthaltene Antibiotikum resistent waren (Abb. 3.4A, C). Das Saatgut heteroplasmatischer Mutterpflanzen führt hingegen zu einer Mischung von Keimlingen, die antibiotikasensitiv und -resistent waren. Diese waren durch die weiße Farbe der Keimblätter (Abb. 3.4B) zu erkennen.

Ein unerwartetes Ergebnis zeigte sich während der Samentests. Die Transformanden zeigten einen hellgrünen gescheckten Phänotyp der Kotyledonen (Abb. 3.4), der jedoch in den Laubblättern nicht beobachtet werden konnte.

Durch Kreuzungen mit untransformierten Pflanzen konnte eine maternale Vererbung nachgewiesen werden, was auf einen plastidenspezifischen Effekt schließen lässt. Der Phänotyp der Keimblätter korrelierte weder mit der Menge des akkumulierten GFP (Kap. 3.3.4) noch mit der Transkriptmenge (Kap. 3.3.3) des Transgens gfp. Auch eine Abhängigkeit



Abbildung 3.2: Schematische Darstellung eines Ausschnitts des Wildtypplastidengenoms und transformierten Plastidengenoms. Für diese Arbeit wesentliche Restriktionsschnittstellen sind schematisch dargestellt. Während der Herstellung des Plasmids pRB 95 deletierte Schnittstellen sind in Klammern gezeigt. aadA – Aminoglycosid-Adenylyltransferase, Prrn und Prrn-SD – ribosomaler RNA-Operon-Promotor ohne und mit SD-Sequenz-Variantenn, TpsbA und Trps16 – Terminatoren der Gene psbA und rps16



Abbildung 3.3: Nachweis transplastomischer Linien mittels Southern-Blot. BglII-geschnittene plastidäre DNA wurde in 1% igen Agarosegelen aufgetrennt und mit einer psaB-Sonde nachgewiesen. Die BglII-geschnittene DNA aus Wildtypproben (WT) und die der Kontrolltransformande (S5, Bock et al., 1994) zeigte eine Bande bei 3,5 kb und transformierte Pflanzen ein Signal bei 5,9 kb.

des Phänotyps von der Art des Transgens konnte nicht beobachtet werden, da auch Transformationen ähnlicher Konstrukte mit nptII als plastidär kodiertes Transgen diesen teilweise zur Folge hatten (Juliane Neupert, persönliche Kommunikation). Zusätzlich konnte dieser Phänotyp nicht mit anderen Konstrukten erkannt werden, die auf pRB 95 als Transformationsvektor und gfp als Transgen basierten – pDK 60 (Daniel Karcher, persönliche Kommunikation). Mit Hilfe von Sequenzierungen konnte ausgeschlossen werden, dass Mutationen in der Homologieregion des Plasmids pRB 95 mit der entsprechenden Region im Plastom als Ursache des Phänotyps in Frage kommen.

Um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, wurden soweit möglich für weitere Experimente nur Linien ausgewählt, die den genannten Phänotyp in den Kotyledonen zeigten. Für weitere Analysen wurden jedoch voll entwickelte Laubblätter verwendet.

Pflanzen der Linien, die mit den Konstrukten pOD 12 und 18 transformiert wurden, zeigten helle Bereiche in den Laubblättern (Abb. 3.5). Das Auftreten dieses Phänotyps korrelierte mit der gemessenen Proteinmenge in Extrakten aus Laubblättern (vgl. 3.3.4). Beide genannten Konstrukte führten in Tabak zu einer sehr hohen GFP-Akkumulation, woraus sich eine leichte Toxizität des GFP in hohen Konzentrationen ableiteten lässt (Tab. 3.3).



Abbildung 3.4: Samentests zur Bestätigung des homoplasmatischen Status einiger transgener Linien. Ausgewählte Samentests zeigen die Bestätigung der Homoplasmie von (A) pOD 17#10A-20, (B) Wildtyp, (C) pOD 4#4A-20. Die Keimlinge wuchsen zwei Wochen auf RM-Medium (500 mg/ml Spectinomycin).



Abbildung 3.5: Der Phänotyp einiger Transformanden, der in voll ausgebildeten Laubblättern deutlich wird. (A) Wildtyp, (B) pOD 18, (C) pOD 1. Transformanden des Konstrukts pOD 18 zeigen hellgrüne Laubblätter, wohingegen ein Großteil der weiteren erzeugten Transformanden wie pOD 1 den Wildtypphänotyp zeigen.

# 3.3 Vergleich der Reportergenexpression in *E. coli* und Tabakplastiden

Der Nachweis der *gfp*-Transkripte erfolgte nach Auftrennung in 1%igen denaturierenden Agarosegelen mit Hilfe von Hybridisierungen mit einer radioaktiv markierten *gfp*spezifischen Sonde (Kap. 2.9). Zusätzlich erfolgten Hybridisierungen mit Sonden (Kap. 2.9) komplementär zur 16S rRNA. Die Expression der 16S rRNA wurde als konstant angenommen und diente daher als Referenz zur Kontrolle der gleichmäßigen Beladung des denaturierenden Agarosegels. Unterschiedlich starke Hybridisierungssignale der 16S rRNA waren auf eine ungleichmäßige Beladung des Blots mit Gesamt-RNA zurückzuführen. Die Hybridisierungssignale konnten mit Hilfe von ImageQuant (GE Healthcare) quantifiziert werden. Die Signale, die aus der Hybridisierung mit einer GFP-spezifischen Sonde gewonnen wurden, wurden mit Hilfe der Werte aus der Hybridisierung mit einer 16S rRNAspezifischen Sonde normalisiert.

 $\frac{GFP-Signal}{16SrRNA-Signal}$ 

Anschließend wurden die gewonnenen relativen Werte mit dem als Referenz dienenden Wert des Konstrukts pOD 1 ins Verhältnis gesetzt.

 $\frac{relatives\ Signal\ pODx}{relatives\ Signal\ pOD1}$ 

Die Proteinakkumulation der *E. coli* und Tabak-Transformanden wurde nach Isolation des gesamten löslichen Proteins mit Hilfe von Western-Blots (Kap. 2.11.3) nachgewiesen. Der Nachweis des GFPs erfolgte mit Hilfe spezifischer Antikörper und Chemolumiszenzreaktionen, die mittels Schwärzung von Röntgenfilmen detektiert wurde. Die Schwärzung wurde anschließend analog zur Analyse der Transkriptakkumulation mit ImageQuant quantifiziert. Die gewonnen Werte konnten darauf folgend zum Referenzkonstrukt pOD 1 in Relation gesetzt werden.

## 3.3.1 Einfluss der SD-Sequenz-Varianten auf die *gfp*-Transkriptakkumulation in *E. coli*

Der Promotor des plastidären ribosomalen RNA-Operons wurde auch in *E. coli* erkannt und führte zur Transkription des Transgens gfp. Die gfp-Transkriptmenge wurde mit Hilfe von Northern-Blot-Analysen nachgewiesen (Kap. 2.9). Als Referenz diente eine zweite Hybridisierung der Membran mit einer 16S rRNA-spezifischen Sonde (Tabelle in Kap. 2.9). Hierdurch wurde es möglich, die relative gfp-Transkriptmenge zu bestimmen.

Es wurde deutlich, dass die Transkriptmengen abhängig von der Konstrukt<br/>identität zwischen 2%und 136% der Transkriptmenge in Bezug zu p<br/>OD 1 schwankten. Die relativen



Abbildung 3.6: Northern-Blot-Hybridisierungen von gfp-Transkripten und der 16S rRNA verschiedener SD-Sequenz-Konstrukte in *E. coli* nach Auftrennung der RNA in 1 % denaturierenden Agarosegelen. pRB 95 wurde als Kontrolle genutzt und entspricht dem leeren Transformationsvektor.

Transkriptmengen bezüglich des Referenzkonstrukts wurden in Tabelle 3.1 dargestellt. Die Transkriptakkumulation des *gfp*-Gens verringerte sich in den meisten Transformanden im Vergleich zum Expressionsniveau des Konstrukts pOD 1 (Abb. 3.6), jedoch nicht in Transformanden der Konstrukte pOD 14, 20 und 21.

Die Anzahl der SD-Sequenzen hatte einen Einfluss auf die Akkumulation des *gfp*-Transkripts. Im Vergleich der Konstrukte von drei Ribosomenbindestellen zu solchen mit zwei Bindestellen zeigten Konstrukte mit vollständigen Translationsinitiationsstellen jedoch nur eine geringe Abnahme der Transkriptmenge. Hierzu zählten die Konstrukte mit kleinen ORFs pOD 4 und 5 (siehe Abb. 3.1), wo eine Reduktion um 5% beobachtet wurde, was innerhalb der Messungenauigkeit liegt. In Konstrukten mit ein bzw. zwei glycinkodierenden ORFs (pOD 8 und 9) zeigte sich eine Verminderung von 21%.

Enthielten die untersuchten Konstrukte nur SD-Sequenzen als Ribosomenbindestellen war der Effekt der Anzahl dieser deutlich stärker. So führte die erhöhte Anzahl in Konstrukten mit Abstand zwischen den SD-Sequenzen (pOD 2 und 3) zu einer Abnahme von 44 % und ohne Abstand (pOD 6 und 7) zu 58 % Reduktion der *gfp*-Transkriptmenge.

Eine vergrößerte Zahl von kleinen ORFs hat einen geringeren Effekt als eine Vielzahl von Ribosomenbindestellen in der 5' UTR.

In den Konstrukten mit multiplen Translationsinitiationsstellen im Abstand von je 41 nt hatte die Vervielfältigung einen starken Abfall der *gfp*-Transkriptmenge zur Folge. In den Konstrukten pOD 14, 15 und 22 (zwei bis vier Translationsinitiationsstellen) konnte eine Verringerung um bis zu 98 % ermittelt werden. Die ähnlichen Konstrukte ohne TEV-Peptidaseschnittstelle (pOD 20 und 21) zeigten hingegen ein völlig anderes Bild. Hier stieg die *gfp*-Transkriptmenge mit zunehmender Anzahl der Translationsinitiationsstellen um 21 % im Vergleich zueinander an.

Konstrukte mit TEV-Schnittstelle zeigten einen Abfall der Transkriptmenge, Konstrukte ohne Peptidaseschnittstelle einen Anstieg der Akkumulation des *gfp*-Transkripts.

Eine direkte Aneinanderreihung von Translationsinitiationsstellen in den Konstrukten pOD 11, 12 sowie pOD 17 und 18 (Abb. 3.1) hatte einen leichten Anstieg der Transkriptakkumulation mit zunehmender Anzahl der Initiationsstellen zur Folge. So akkumulierte pOD 12 46 % und pOD 18 31 % mehr *gfp*-Transkript als pOD 11 bzw. pOD 18.

Der Vergleich der Konstrukte, die nur eine SD-Sequenz enthalten, zeigte ebenfalls Unterschiede in der Akkumulation des gfp-Transkripts. pOD 13, das die Gen 10 5'UTR mit einer TEV-Erkennungsstelle kombiniert, erreichte nur 55 % der mRNA-Menge von pOD 1. Einzelne Nukleotidaustausche in der 5'UTR entfalten hingegen nur einen geringen Effekt, da im Konstrukt pOD 19 die Entfernung von potentiellen Stopcodons 5' der SD-Sequenz zu einer Akkumulation von 90 % der gfp-Menge führte.

#### 3.3.2 Einfluss der SD-Sequenz-Varianten auf die Proteinakkumulation von GFP in *E. coli*

Die Proteinakkumulation in den verschiedenen *E. coli*-Transformanden wurde mit Hilfe von Western-Blots (Kap. 2.11.3) bestimmt und ist in Abbildung 3.7 dargestellt. Hierbei

	Namo	RNA	Protein $pODr/pOD 1$	Ffigiong	
			podx/pod i	Emzienz	
	pOD 1	$1,\!00$	1,00	$^{1,00}$	
	pOD 2	$0,\!66$	0,81	$^{1,23}$	
	pOD 3	$0,\!56$	0,78	$1,\!39$	
	pOD 4	$0,\!20$	0,01	$0,\!05$	
	m pOD5	$0,\!19$	0,06	0,31	
	pOD 6	$0,\!24$	0,12	$0,\!49$	
	pOD 7	$0,\!10$	0,05	$0,\!48$	
	pOD 8	$0,\!14$	0,01	$0,\!05$	
	pOD 9	$0,\!11$	0,05	0,47	
	pOD 11	$0,\!37$	0,62	$1,\!68$	
	pOD12	$0,\!54$	0,73	$1,\!36$	
	pOD13	$0,\!55$	0,06	$0,\!10$	
	pOD 14	$1,\!35$	1,35	$^{1,00}$	
	pOD15	$0,\!11$	1,70	$14,\!94$	
	pOD17	$0,\!39$	0,72	$1,\!84$	
	pOD18	0,51	1,25	$^{2,47}$	
	pOD 19	$0,\!90$	1,11	$^{1,23}$	
	pOD 20	$1,\!12$	1,26	$1,\!13$	
	pOD21	1,36	1,40	$^{1,03}$	
	pOD 22	0,02	1,68	71,10	
50D4	50D6 50D7	0008 0009 11000	00012 0001 00013	0014 0015	100
_	-				-

Tabelle 3.1: *gfp*-Transkriptmenge und GFP-Akkumulation in *E. coli* für jedes Konstrukt im Verhältnis zum Konstrukt pOD 1 normalisiert auf den Gehalt der 16S rRNA.



Abbildung 3.7: GFP-Akkumulation in *E. coli*, die mit Hilfe eines Western-Blots nachgewiesen wurde. Unterschiedliche Mengen an aufgetragenem gesamtlöslichen Protein sind jeweils für jede Probe angegeben. Als Kontrolle diente *E. coli* transformiert mit leerem pRB 95.

zeigte sich, dass wie für die Transkriptmengen eine große Fluktuation über die Konstruktvarianten erkannt werden kann (Tab. 3.1). Bezogen auf die Proteinmenge des Konstrukts pOD 1 kommt es zu Schwankungen zwischen 1 % (pOD 8) und 170 % (pOD 15).

Konstrukte, die keine Vervielfachung von Translationsinitiationsstellen enthielten, die direkt zur Translation des *gfp* führten (pOD 2 bis pOD 9), hatten eine Verringerung der Proteinakkumulation im Vergleich zum Referenzkonstrukt (pOD 1) zur Folge. Im Gegensatz dazu führte die Einführung von multiplen Translationsinitiationsstellen in nahezu allen Konstrukten zu einer Erhöhung der GFP-Menge.

Die Erhöhung der Anzahl der Ribosomenbindestellen bzw. Translationsinitiationsstellen hatte in *E. coli* einen Effekt auf die GFP-Akkumulation. So führten direkt aneinandergereihte Ribosomenbindestellen (pOD 6 und 7; Abb. 3.1) in *E. coli* im Vergleich der beiden Varianten zueinander zu einer Verringerung der Akkumulation um 58 %. Ribosomenbinde-

Tabelle 3.2: Relative Anteile der aus der Nutzung von verschiedenen Translationsinitiationsstellen resul-
tierenden GFP-Varianten an der gesamten GFP-Akkumulation der jeweiligen E. coli-Transformanden.
Die Nummerierung erfolgt in 3'->5' Richtung, wodurch die erste SD-Sequenz, die der GFP kodierenden
Region nächstliegende ist.

Konstrukt	SD-Position $3' \rightarrow 5'$	Anteil an der GFP-Akkumulation
pOD 11	$\frac{1}{2}$	$49,26~\%\ 50,74~\%$
pOD 12	$\begin{array}{c}1\\2\\3\end{array}$	$\begin{array}{c} 40,41\ \%\\ 31,08\ \%\\ 28,52\ \%\end{array}$
pOD 14	1 2	$14,73~\%\ 85,27~\%$
pOD 15	$\begin{array}{c}1\\2\\3\end{array}$	$15,57\ \%\ 51,98\ \%\ 32,46\ \%$
pOD 22	$\begin{array}{c}1\\2\\3\\4\end{array}$	$\begin{array}{c} 11,71\ \%\\ 54,02\ \%\\ 11,28\ \%\\ 22,99\ \%\end{array}$
pOD 17	$\frac{1}{2}$	$56,\!14\%$ $43,\!86\%$
pOD 18	$\begin{array}{c}1\\2\\3\end{array}$	$\begin{array}{c} 49,11\ \%\\ 20,10\ \%\\ 30,80\ \%\end{array}$
pOD 20	$\frac{1}{2}$	$32,20\ \%\ 67,80\ \%$
pOD 21	$\begin{array}{c}1\\2\\3\end{array}$	$20,75\ \%\ 46,49\ \%\ 32,76\ \%$

stellen, die die gleichzeitige Bindung mehrerer Ribosomen an die 5' UTR erlauben (pOD 2 und 3), führten mit steigender Anzahl der Ribosomenbindestellen zu einer nahezu gleichbleibenden Proteinakkumulation des Reporterproteins (Tab. 3.1). Im Vergleich zu Konstrukten mit direkt aneinandergereihten Ribosomenbindestellen erreichten Konstrukte, die eine erhöhte Ribosomenkonzentration erzielen sollten, eine deutlich höhere Proteinakkumulation. So erzielten die Konstrukte pOD 2 und 3 ca. 80 % des Referenzkonstrukts, jedoch pOD 6 und 7 nur ca. 8 %.

Kleine ORFs in der 5'UTR entfalten bei Vervielfältigung einen ähnlichen Effekt. So stieg die Proteinakkumulation bei einem ORF im Vergleich zu zwei ORFs an. Dieser Anstieg war unabhängig davon, ob der ORF ein Glycincodon oder kein Codon enthielt (pOD 8, 9 und pOD 4, 5; Abb. 3.1). Beide Konstruktserien führten zu eine fünf- bis sechsfachen Proteinakkumulation bei Verdreifachung der Translationsinitiationsstellen im Vergleich zur Verdopplung. Die Akkumulation im Vergleich zum Referenzkonstrukt pOD 1 lag mit im Durchschnitt 3 % sehr niedrig.

Bei einer Vervielfachung der Translationsinitiationsstellen konnte mit zunehmender Anzahl dieser eine Verstärkung der Translation ermittelt werden. Aneinandergereihte Translationsinitiationsstellen führten bei einer Verdreifachung zu einer stärkeren Proteinakkumulation als bei einer Verdopplung. Bei den Konstrukten mit TEV-Erkennungssequenz führte die Verdreifachung (pOD 12) zu einem Anstieg der Proteinakkumulation um 18 % im Vergleich zur Verdopplung der Translationsinitiationsstellen (pOD 11). Ohne TEV-Peptidaseschnittstelle war der Effekt mit einem Anstieg von 74 % deutlich stärker ausgeprägt. Konstrukte, die eine erhöhte Ribosomenkonzentration durch gleichzeitige Bindung an der 5' UTR erlaubten, zeigten ähnliche Effekte. Mit kodierter TEV-Schnittstelle (pOD 14 und 15) konnte eine Steigerung um 26 % und ohne diese Erkennungssequenz (pOD 20 und 21) eine Steigerung um 11 % ermittelt werden.

Im Vergleich der Konstrukte, die nur eine SD-Sequenz enthalten (pOD 1, 13 und 19), konnte ebenfalls ein Effekt der TEV-Erkennungssequenz erkannt werden. So zeigte das Konstrukt mit Gen 10 5' UTR und TEV-Sequenz einen Rückgang der Proteinakkumulation um 94 %. Im Gegensatz hierzu hatten einzelne Nukleotidaustausche zur Ausschaltung von Stopcodons im Konstrukt pOD 19 (Abb. 3.1) nur einen geringen Einfluss und verursachten eine Steigerung der GFP-Menge um 10 %.

Für Konstrukte mit multiplen Translationsinitiationsstellen konnte mit Hilfe des Western-Blots gezeigt werden, dass diese in unterschiedlichem Maße genutzt wurden. So zeigte das Konstrukt pOD 14 ein Bandenmuster, das eine sehr starke Nutzung (85%) der strangaufwärts gelegenen SD-Sequenz und nur eine sehr schwache Nutzung (15 %) der Translationsinitiationsstelle, die im Konstrukt pOD 13 ebenfalls zu finden ist, erkennen ließ (Tab. 3.2). Um einen Effekt des N-Terminus auf die GFP-Akkumulation in pOD 14 sowie allen weiteren Konstrukten mit multiplen Translationsinitiationsstellen auszuschließen, wurde sichergestellt, dass der N-Terminus an den ersten zwei Positionen die gleiche Aminosäuresequenz enthält. Ein ähnliches Bandenmuster zeigte die pOD 15-Transformande. Hier konnte eine zusätzliche Bande erkannt werden, die der dritten Translationsinitiationsstelle zuzuschreiben war. Diese Bande war im Konstrukt pOD 22 stark abgeschwächt, wobei jedoch eine zusätzliche starke Bande entsprechend der vierten SD-Sequenz zu beobachten war. Das Verhältnis in den beiden letztgenannten Konstrukten betrug 5'→3' 32 %-52 %-16 % in pOD 15 und 23 %-11 %-54 %-11 % in pOD 22. Ein ähnliches Muster wie in pOD 14 und 15 ließ sich für die Konstruktreihe pOD 19 bis 21 erkennen. Hier zeigte sich jedoch, dass die von pOD 19 bereitgestellte Translationsinitiationsstelle eine deutlich stärkere Nutzung erfuhr als die von pOD 13 in der Reihe von pOD 13 bis 15 sowie pOD 22. Deshalb trug die 3' gelegene Translationsinitiationsstelle deutlich stärker zur GFP-Gesamtmenge in pOD 20 (68 %–32 %) und 21 (32 %–46 %–20 %) bei.

Für pOD 11 und 12 konnte kein Muster erkannt werden, dass eine unterschiedlich starke Nutzung der SD-Sequenzen nahe legte. Hier waren alle beobachteten Banden im WesternBlot ungefähr gleich stark. So zeigte das Konstrukt pOD 11 eine Verteilung von 50 %-50 % und die GFP-Akkumulation des Konstrukts pOD 12 ein Verhältnis von 29 %-31 %-40 %. Ein davon abweichendes Bild zeigten die Konstrukte pOD 17 und 18. Hier ließen sich Unterschiede in der Nutzung der SD-Sequenzen erkennen  $5'\rightarrow 3'$  44 %-56 % (pOD 17) und 30 %-20 %-50 % (pOD 18). In pOD 17 ist die Bande, die der Nutzung der 5'SD-Sequenz entspricht geringfügig schwächer als die der 3'SD-Sequenz. In der Probe des Konstrukts pOD 18 waren die Banden, die der Nutzung der 5' und 3' Translationsinitiationsstelle entsprachen, ungefähr gleich stark. Die schwache Bande, erkennbar zwischen den beiden starken Banden (Abb. 3.7) in der Probe pOD 18, resultiert aus der Translationsinitiation an der mittleren SD-Sequenz.

#### 3.3.3 Einfluss der SD-Sequenz-Varianten auf die gfp-Transkriptakkumulation in N. tabacum



Abbildung 3.8: Northern-Blot-Hybridisierungen von *gfp*-Transkripten und der 16S rRNA verschiedener SD-Sequenz-Konstrukte in *N. tabacum*. Als Vergleichslinie wurden Pflanzen der Linie S5 genutzt. WT entspricht dem Wildtypkultivar Petit Havanna. Die obere Bande der Hybridisierung mit der GFP-Sonde stellt Durchlesetranskripte dar, die durch unvollständige Termination der RNA-Polymerisation gebildet werden.

Die Transkriptmenge des gfp-Gens wurde mit Hilfe von Northern-Blots (Abb. 3.8) analog zu den Transkriptmengen in *E. coli* bestimmt. Nach Hybridisierung mit einer gfpspezifischen Sonde konnten zwei Banden detektiert werden. Hier zeigte sich, dass die Termination der Transkription am rps16-Terminator nicht vollständig verläuft. Die zweite Transkriptspezies beinhaltet die Sequenz bis zum 3' liegenden Gen der tRNA-fMet. Weiterhin zeigte sich, dass es zu starken Unterschieden in der Transkriptakkumulation im Vergleich der verschiedenen Konstrukte kam. Im Vergleich zu pOD 1 konnten Mengenunterschiede von 8% bis zu > 250% beobachtet werden (Tab. 3.3), was eine größere Schwankungsbreite als in E. coli darstellt.

Im Vergleich der Konstrukte mit steigender Anzahl der SD-Sequenzen zeigten sich deutliche Unterschiede. Die *gfp*-Transkriptmenge der Konstrukte pOD 2 und pOD 3 sowie pOD 6 und pOD 7, die eine Vervielfachung der Ribosomenbindestellen enthielten (Abb. 3.1), zeigten eine Verringerung der Transkriptakkumulation um 14 % bzw. 11 % mit steigender Anzahl der SD-Sequenzen. Hierbei spielte der Abstand der SD-Sequenzen eine untergeordnete Rolle.

Uneinheitliche Ergebnisse lieferten die Konstrukte, die Start-Stopcodonkombinationen (kleine ORFs) enthielten. Für das Konstrukte pOD 5 konnte eine um 69 % verringerte *gfp*-Transkriptmenge im Vergleich zu pOD 4 ermittelt werden, wohingegen das Konstrukt pOD 9 im Vergleich zu pOD 8 eine verstärkte Transkriptakkumulation um 34 % aufwies (Tab. 3.3). Erstere Konstruktserie enthielt leere ORFs in der 5' UTR, letztere enthielt ein Glycincodon in den ORFs.

Konstrukte, die vollständige Translationsinitiationsstellen enthielten, zeigten ebenfalls uneinheitliche Ergebnisse. So zeigte sich für die Konstrukte, die eine Vervielfachung der Translationsinitiationsstellen mit 41 nt Abstand enthielten, eine Abnahme der RNA-Akkumulation um 87 % im Vergleich zwischen pOD 20 und 21. Im Gegensatz hierzu konnte eine Zunahme um 164 % für pOD 14 im Vergleich zu pOD 15 beobachtet werden. Der Unterschied zwischen diesen SD-Sequenz-Varianten ist die zusätzlich zu den Translationsinitiationsstellen enthaltene TEV-Sequenz.

In Konstrukten, die dicht aufeinander folgende Translations<br/>initiationsstellen enthielten, konnte eine gleichartige Abhängigkeit der <br/> gfp-Transkriptakkumulation von der Anzahl der Initiationsstellen gemessen werden. Für die Konstrukte pOD 11 und 12 war die Zunahme jedoch deutlich stärker mit einer 21-fachen Zunahme gegenüber einer Erhöhung der Transkriptmenge um 110 % im Vergleich pOD 11 zu 12 bzw. pOD 17 zu 18.

Wurden die Konstrukte pOD 1, pOD 13 und pOD 19 verglichen (Abb. 3.1), fiel auf, dass auch hier deutliche Unterschiede in der gfp-Akkumulation auftraten. So erhöhte sich die RNA-Menge des Konstrukts pOD 13 im Vergleich zu pOD 1 um 21 % und die des Konstrukts pOD 19 um 120 %.

## 3.3.4 GFP-Akkumulation in Plastiden von *N. tabacum* in Abhängigkeit von verschiedenen SD-Sequenz-Varianten

Die Proteinakkumulation von GFP in transformierten Pflanzen unterlag ebenso wie in  $E. \ coli$  starken Schwankungen im Vergleich der verschiedenen Konstrukte. So zeigte sich eine Schwankungsbreite von keiner messbaren Akkumulation (pOD 13) bis hin zu einer fünffachen Menge an GFP (pOD 12) im Vergleich zu pOD 1.

In Abbildung 3.9 sind die Ergebnisse der Western-Blot-Analyse dargestellt. Es ist zu beachten, dass für einzelne Proben eine höhere bzw. niedrigere Menge an gesamtlöslichem Protein aufgetragen werden musste, um die Nachweisgrenzen des Western-Blots einzu-

	RNA	Protein	
Name	pODx/pOD1	pODx/pOD1	Effizienz
pOD 1	$1,\!00$	1,00	$1,\!00$
pOD 2	$1,\!57$	$1,\!12$	0,71
pOD 3	$1,\!36$	0,92	$0,\!68$
pOD 4	1,72	0,62	0,36
m pOD5	0,53	0,19	0,36
pOD 6	$1,\!06$	0,71	$0,\!67$
pOD 7	0,95	$0,\!19$	$0,\!20$
pOD 8	$1,\!49$	0,02	$0,\!01$
pOD 9	$2,\!00$	0,03	$0,\!02$
pOD 11	0,08	0,01	$0,\!19$
pOD12	1,72	5,08	$2,\!96$
pOD 13	$1,\!21$	0,00	$0,\!00$
pOD 14	$0,\!14$	0,07	$0,\!47$
pOD15	$0,\!37$	$0,\!15$	$0,\!40$
pOD 17	$1,\!21$	1,29	$1,\!07$
pOD18	$2,\!53$	4,09	$1,\!62$
pOD 19	$^{2,20}$	$^{1,01}$	$0,\!46$
pOD 20	$2,\!23$	2,01	$0,\!90$
pOD 21	$0,\!28$	0,37	$1,\!32$

Tabelle 3.3: gfp-Transkriptmenge für jedes Konstrukt im Verhältnis zum Konstrukt pOD 1 in N. tabacum (normalisiert auf den Gehalt der 16S rRNA)

halten. Die Daten der Quantifizierung mit Hilfe von ImageQuant sind in Tabelle 3.3 zusammen mit den Daten zur RNA-Akkumulation zusammengefasst und im Verhältnis zum Referenzkonstrukt pOD 1 dargestellt.

Mit Zunahme der Anzahl an SD-Sequenzen konnte, in Konstrukten mit einer einfachen Vervielfältigung dieser, eine Abnahme der GFP-Akkumulation beobachtet werden. Es zeigten pOD 2 verglichen mit pOD 3 sowie pOD 6 im Vergleich zu pOD 7 (Abb. 3.1) eine Abnahme der GFP-Akkumulation von 18 % bzw. 73 % (Abb. 3.9). Für Konstrukte mit Translationsinitiationsstellen in Kombination mit Stopcodons zeigte sich eine Abnahme der Proteinmenge von 70 % zwischen pOD 4 und pOD 5. Da die GFP-Akkumulation der Konstrukte pOD 8 und pOD 9 am Rand der Nachweisgrenze lag, konnte hierfür keine verlässliche Aussage über die Menge an GFP getroffen werden. Ein Anstieg der Proteinmengen von GFP konnte in nahezu allen Konstrukten mit vollständigen Translationsinitiationsstellen im Vergleich der Konstrukte mit zwei zu drei Initiationsstellen erkannt werden. Wurden die entsprechenden Translationsinitiationsstellen dicht aufeinander folgend in die 5'UTR eingefügt, erhöhte sich die GFP-Akkumulation in den Konstrukten pOD 11 im Vergleich zu pOD 12 von einem nicht messbaren Wert auf das Fünffache des Referenzwertes von pOD 1. In pOD 17 verglichen mit pOD 18 erfolgte ein Anstieg auf das dreifache. Wurde ein Abstand von 41 nt zwischen den Translationsinitiationsstellen eingefügt, zeigte sich ein differenzierteres Bild. So konnte im Vergleich der Konstrukte pOD 14 und 15 eine Verdopplung der GFP-Akkumulation gemessen werden. Entgegengesetzt dazu erreichte das Konstrukt pOD 21 nur 18 % der in pOD 20 gebildeten Proteinmenge.

Im Vergleich der Konstrukte, die ähnlich zum Referenzkonstrukt waren (Abb. 3.1), ließen sich wie in *E. coli* wesentliche Unterschiede in der Proteinakkumulation erkennen (vgl. Kap. 3.3.2). pOD 13, das im Vergleich zum Referenzkonstrukt pOD 1 eine TEV-Erkennungssequenz enthielt, erzielte eine nicht messbare GFP-Akkumulation. pOD 19 hingegen mit Nukleotidaustauschen 5' der einzigen SD-Sequenz erreichte eine gleich hohe Proteinmenge wie pOD 1. Während eine Vervielfältigung von SD-Sequenzen zur gleichzei-



Abbildung 3.9: GFP-Akkumulation in *N. tabacum*, die mit Hilfe von Western-Blots nachgewiesen wurde. Die Mengen an aufgetragenem gesamtlöslichen Protein sind für jede Probe angegeben.

tigen Bindung mehrerer Ribosomen in pOD 2 und pOD 3 noch zu einer zu pOD 1 vergleichbaren Proteinakkumulation führte, variierte die Gesamtmenge an GFP bei den anderen getesteten Konstrukten stark im Vergleich zu pOD 1 (Tab. 3.3). In pOD 6 und pOD 7, die direkt aneinandergereihte SD-Sequenzen enthielten und damit eine vergrößerte Anzahl von potentiellen Ribosomenbindestellen enthielten, konnten jedoch nur 70 % bzw. 19 % des Proteingehalts des Referenzkonstrukts pOD 1 nachgewiesen werden.

Für Konstrukte, die Translationsinitiationsstellen in Kombination mit Stopcodons enthielten, wurden ebenfalls sinkende GFP-Akkumulationen ermittelt. So zeigten die Konstrukte pOD 4 und pOD 5, die leere ORFs enthielten, eine Akkumulation von nur 62 % bzw. 20 % des Referenzkonstrukts pOD 1. pOD 8 und pOD 9 lagen hingegen mit einer extrem niedrigen Proteinmenge am Rand der Nachweisgrenze und konnten nicht quantifiziert werden. In pOD 8 und 9 hatte die Translation des Dipeptids fMet–Gly offenbar einen negativen Effekt auf die Translation des GFP-Leserasters.

Konstrukte, die vollständige Translationsinitiationsstellen enthielten, die dicht aufeinander folgend in die 5'UTR eingefügt wurden, zeigten eine sehr hohe Proteinakkumulation im Vergleich zu pOD 1, insbesondere wenn drei SD-Sequenzen vorhanden waren. So akkuTabelle 3.4: Die relativen Anteile der aus der Nutzung von verschiedenen Translationsinitiationsstellen resultierenden GFP-Varianten an der gesamten GFP-Akkumulation der jeweiligen *N. tabacum*-Transformanden. Die Nummerierung erfolgt in  $3^{\circ} \rightarrow 5^{\circ}$  Richtung, wodurch die erste SD-Sequenz, die der GFP-kodierenden Region nächstliegende ist. Banden, die mit NA bezeichnet wurden, ergaben in der Quantifizierung keine messbaren Werte.

$\operatorname{Konstrukt}$	SD-Position	Anteil an der
	$3' \rightarrow 5'$	GFP-Akkumulation
OD 11	1	NA
pODII	2	100~%
	1	5,78~%
pOD12	2	$18,\!34~\%$
	3	$75{,}88\%$
rOD 14	1	NA
POD 14	2	100~%
	1	NA
pOD15	2	$55,\!93\%$
	3	$44{,}07\%$
nOD 17	1	40,01~%
pont	2	$59{,}99~\%$
	1	4,43~%
pOD18	2	17,75~%
	3	$77,\!82~\%$
D O D 20	1	$19{,}90~\%$
pod 20	2	$80{,}10~\%$
	1	2,38%
pOD 21	2	$71{,}26~\%$
	3	26,35~%

mulierten pOD 12 und 18 die fünffache bzw. vierfache Menge an GFP. Wurde ein Abstand zwischen die Translationsinitiationsstellen von 41 nt eingefügt, ergab sich kein klares Bild. So konnte für die Konstrukte pOD 14 und 15 eine GFP-Menge von lediglich ca. 10% im Vergleich zu pOD 1 ermittelt werden, wohingegen die Konstrukte pOD 20 und 21 eine Proteinmenge von 200% bzw. 37% des Referenzkonstrukts erreichten.

Ebenso wie in *E. coli* führten multiple Translationsinitiationsstellen zur Bildung verschiedener GFP-Varianten. Diese enthielten N-terminale Verlängerungen, wodurch sie sich mit Hilfe der Polyacrylamid-Gelelektrophorese auftrennen und einzeln quantifizieren ließen (Tabelle 3.4). In Pflanzen, die mit dem Konstrukt pOD 11 transformiert wurden, konnte nur die GFP-Variante, die aus der Nutzung der 5'SD-Sequenz resultierte, nachgewiesen werden (Abb. 3.9). Die 3'SD-Sequenz erfuhr ebenso in pOD 12 eine sehr geringe Nutzung. Hier zeigte die Translationsinitiationsstelle am 5'Ende des Konstrukts die stärkste Nutzung. Diese betrug ca. 76 %, wobei die zweite Translationsinitiationsstelle mit 18 % und die 3' gelegene SD-Sequenz mit 6 % zur Gesamtmenge an GFP beitrugen. Keine messbare Nutzung der 3'SD-Sequenz konnte in pOD 14 festgestellt werden. Dies ließ auf eine sehr schwache oder keine Nutzung der SD-Sequenz schließen, die als einzelne SD-Sequenz in pOD 13 vorhanden war, was konsistent mit der geringen Effizienz von pOD 13 war. In dem Konstrukt pOD 15 zeigte sich ein ähnliches Verhalten. Hier trugen nur die beiden 5' gelegenen SD-Sequenzen zur GFP-Akkumulation mit 44 % bzw. 56 % bei. Für die Konstrukte pOD 17 bis 20 zeigte sich ein ähnliches Bild wie in den schon beschriebenen Konstrukten, da auch hier die 5' Translationsinitiationsstelle am stärksten zur GFP-Akkumulation beitrug. So zeigte sich für die Konstrukte pOD 17 und 18 eine Längenverteilung von 60 %–40 % bzw. 78 %–18 %–4 %(5'  $\rightarrow$  3'; Abb. 3.9). Im Konstrukt pOD 20 führten die Translationsinitiationsstellen, die eine Bindung mehrerer Ribosomen an der 5' UTR ermöglichten, zu einer Verteilung von 80 %–20 %. Die Translationsinitiationsstelle, die in pOD 20 zu einer starken Proteinakkumulation führte, wurde auch in pOD 21 mit 71 % am stärksten genutzt. Die Translation der verschiedenen GFP-Varianten führte in diesem Konstrukt zu einer Verteilung von 26 %–71 %–2 %. Im Vergleich zu pOD 15, das pOD 21 bis auf die TEV-Erkennungssequenz entspricht, kam es so zu einer Verschiebung der vorrangigen Nutzung von der 5' gelegenen SD-Sequenz zu der mittleren Initiationsstelle.

### 3.4 Einfluss der RNA-Faltung auf die Translationsinitiation

Die Sekundärstruktur der 5' UTR besitzt einen wesentlichen Einfluss auf die Stabilität und Zugänglichkeit der RNA für Ribosomen (Neupert *et al.*, 2008). Eine *in vivo*-Bestimmung der RNA-Struktur war im Rahmen dieser Arbeit und ist generell nur mit großem Aufwand nicht möglich. Aus diesem Grund wurde die Sekundärstruktur der 5' UTR mit Hilfe des Programms mfold 3.2 (Mathews *et al.*, 1999; Zuker, 2003) bestimmt. Diese *in silico* Methode dient ebenfalls der Abschätzung der freien Enthalpie der berechneten Sekundärstruktur bei 37 °C (Standardparameter). Als Grundlage der Berechnung wurde die RNA-Sequenz genutzt, die vom Transkriptionsstart bis einschließlich des Startcodons von GFP reicht. Dies wurde auch bei Vorhandensein einer TEV-Erkennungssequenz beibehalten, weshalb die *in silico* gefaltete Sequenz wesentlich durch diese Sequenz verlängert wurde. Es handelt sich in den verschiedenen Konstrukten (z.B. pOD 15 oder 22) nicht um die reine 5' UTR, da Teile dieser Sequenz ausgehend von 5' gelegenen Startcodons translatiert wurden.

Für die verschiedenen Konstrukte ergaben sich deutlich verschiedene Werte der Faltungsenthalpien, die in Tabelle 3.5 angegeben sind. Die *in silico* gewonnenen Sekundärstrukturen sind im Anhang (Abb. A.1 - A.20) dargestellt.

Die Werte der freien Enthalpie variierten sehr stark in Abhängigkeit der Konstrukte. Den höchsten Wert erreichte das Konstrukt pOD 4 (-12,80 kJ/mol), den niedrigsten pOD 22 (-44,99 kJ/mol), was eine deutlich stabilere Sekundärstruktur in pOD 22 impliziert. Dieser Wert ergibt sich jedoch nicht durch eine große Stamm-Schleifen-Struktur, sondern durch eine Vielzahl kleiner doppelsträngiger Bereiche.

Konstruktname	freie Enthalpie	Länge der 5'UTR
	$(\Delta G  ext{ in kJ/mol})$	$(\mathrm{bp})$
pOD 1	-13,80	79
pOD 2	-20,48	125
$\mathrm{pOD}3$	-30,08	171
pOD 4	-12,80	103
$\mathrm{pOD}5$	-20,84	127
m pOD6	-14,40	89
m pOD~7	$-15,\!60$	99
pOD 8	-19,80	106
pOD 9	-22,30	133
pOD 11	-22,11	127
m pOD12	-26,12	148
pOD~13	$-23,\!80$	106
pOD 14	-31,91	154
m pOD15	-35,53	202
m pOD17	-18,20	100
$pOD \ 18$	-16,43	121
pOD 19	$-16,\!60$	79
pOD 20	-28	127
m pOD21	-30,79	175
pOD 22	-44,99	250

Tabelle 3.5: Freie Faltungsenthalpien der untersuchten Konstrukte unter Standardbedingungen von mfold 3.2 (Mathews *et al.*, 1999; Zuker, 2003)

Um den Effekt unterschiedlicher Längen der betrachteten 5' UTR auszugleichen, wurde die freie Enthalpie auf die betrachtete Nukleotidzahl bezogen. So erreichten Konstrukte, die wie das Referenzkonstrukt pOD 1 (-0,174 kJ/(mol\*bp)) nur eine SD-Sequenz enthalten, sehr niedrige Werte. So ergab pOD 13 den sehr niedrigen Wert von -0,224 kJ/(mol\*bp) und pOD 19 -0,21 kJ/(mol\*bp).

Mit zunehmender Länge der 5' UTR zeigte sich ein Trend zu niedrigeren Faltungsenthalpien. Dies zeigte sich am Beispiel von pOD 11 und 12 mit -22,1 kJ/mol bzw. 26,1 kJ/mol. Diese Konstrukte enthielten vervielfältigte Translationsinitiationsstellen, die direkt aufeinander folgten. Für die ähnlichen Konstrukte pOD 17 und 18 traf diese Abnahme der freien Enthalpie jedoch nicht zu. Bei diesen Konstrukten nahm die freie Enthalpie mit zunehmender Länge der 5' UTR zu.

Für nahezu keines der Konstrukte konnte eine stabile Sekundärstruktur ermittelt werden, die eine oder mehrere SD-Sequenzen einbezog. Einzige Ausnahme bildete das Konstrukt pOD 3, für das ein längerer doppelsträngiger Bereich ermittelt wurde, der zwei SD-Sequenzen umfasste (Abb. A.3). Jedoch konnte im Vergleich zu pOD 2 (Abb. A.2), wo eine ähnliche Struktur nicht simuliert wurde, weder in Plastiden noch in *E. coli* ein auffälliger Unterschied in der Translationsinitiationseffizienz oder RNA-Stabilität beobachtet werden (Tab. 3.1, Tab. 3.3).

Am Beispiel von pOD 12 (Abb. 3.1) konnte erkannt werden, dass die simulierte Sekundärstruktur weder in *E. coli* noch in Plastiden einen wesentlichen Einfluss auf die Erkennung einzelner SD-Sequenzen hat. So konnte in Abbildung A.11 (S. 128) im Bereich der zweiten SD-Sequenz ein größerer einzelsträngiger Bereich erkannt werden. Jedoch zeigte sich keine bevorzugte Nutzung der zugehörigen Translationsinitiationsstelle in *E. coli* oder Plastiden von Tabak (Tab. 3.2 (S. 55), Tab. 3.4 (S. 61)).

## 3.5 Zusammenfassung der Transkriptions- und Translationsdaten zur Translationseffizienz in beiden untersuchten Systemen

Nach Bestimmung der Transkriptmenge des *gfp*-Gens und der Proteinmenge war es möglich, eine Gesamteffizienz der Translationsinitiation zu bestimmen. Hierzu wurden die auf das Referenzkonstrukt pOD 1 bezogenen Daten genutzt. Die RNA- und Proteindaten wurden verrechnet, um Effekte unterschiedlicher RNA-Mengen auf die Proteinakkumulation auszugleichen. Eine verringerte Transkriptmenge ließ sich bei gleichbleibender Proteinakkumulation als eine Erhöhung der Initiationseffizienz interpretieren. Die Berechnung der Effizienz erfolgte nach folgender Formel:

 $\frac{Protein \ pODx/pOD1}{RNA \ pODx/pOD1}$ 

#### 3.5.1 Untersuchung der Translationseffizienz in E. coli

Name	Effiz	zienz	relative Veränderung
	$2\mathrm{SD}$	$3\mathrm{SD}$	_
pOD 2, 3	$1,\!23$	1,39	$1,\!13$
pOD4,5	$0,\!05$	0,31	6,2
pOD6, 7	$0,\!49$	0,48	0,98
pOD 8, 9	$0,\!05$	0,47	9,4
pOD11,12	$1,\!68$	1,36	0,80
pOD 14, 15	1	$14,\!94$	15
pOD15, 22	14,94	$71,\!10$	4,76
pOD17, 18	$1,\!84$	2,47	$1,\!34$
pOD 20,21	$1,\!13$	1,03	0,91

Tabelle 3.6: Translationsinitiationseffizienz in Abhängigkeit der Anzahl der SD-Sequenzen in E. coli.

In Tabelle 3.1 sind die berechneten Werte für die Translationsinitiationseffizienz dargestellt und in Tabelle 3.6 zusammengefasst. Teilweise starke Verringerungen der Proteinakkumulation korrelieren mit verringerten Transkriptmengen. Als Beispiel hierfür konnten die Konstrukte pOD6 und 7 angeführt werden.

Eine erhöhte Anzahl von SD-Sequenzen bzw. Translationsinitiationsstellen führte in nahezu allen untersuchten Konstrukten zu einer steigenden Translationseffizienz. Dies zeigte sich unter anderem für die Konstrukte mit multiplen SD-Sequenzen mit oder ohne Abstand von 39 nt. Im Vergleich der Konstrukte pOD 2 zu pOD 3, die einen Abstand von 39 nt zwischen den SD-Sequenzen aufwiesen, konnte eine Steigerung um 13 % (Tab. 3.6) ermittelt werden. Die beiden Konstrukte ohne Abstand zwischen den SD-Sequenzen (pOD 6 und 7) zeigten jedoch keine Steigerung der Initiationseffizienz.

Konstrukte, die kleine ORFs in der 5'UTR beherbergten, zeigten einen sehr deutlichen Anstieg der Translationseffizienz im Vergleich zueinander. Hier zeigte das Konstrukt pOD 5 im Vergleich zu pOD 4 einen Anstieg um 500 % und das Konstrukt pOD 9 verglichen mit pOD 8 einen Anstieg von 800 % (Tab. 3.6). Die Konstrukte mit eingebetteten ORFs zeigten somit massive relative Steigerungen, jedoch nur geringe absolute Werte im Vergleich zu pOD 1. Es ergaben sich somit keine absoluten Steigerungen der GFP-Menge im Vergleich zu pOD 1.

Für die untersuchten Konstrukte mit vervielfältigten vollständigen Translationsinitiationsstellen wurden uneinheitliche Werte ermittelt. So zeigten einige Konstrukte mit direkt aufeinanderfolgenden Translationsinitiationsstellen eine Verringerung der Initiationseffizienz won pOD 11 verglichen mit pOD 12 um 20 %. Der Vergleich des Konstrukts pOD 17 mit pOD 18 zeigte jedoch eine Steigerung um 34 %. Für die Konstrukte mit Translationsinitiationsstellen in einem Abstand von 41 nt wurde ebenfalls ein uneinheitliches Bild gefunden. So erzielten die Konstrukte pOD 20 und 21 eine Senkung der Effizienz um 9 %, wohingegen die Konstruktreihe pOD 14, 15 und 22 eine Steigerung der Effizienz auf das 15fache bzw. um 370 % erreichten (Tab. 3.6).

Die Konstrukte, die ähnlich zu pOD 1 nur eine SD-Sequenz enthielten, erreichten ebenfalls deutlich verschiedene Initiationseffizienzen. So konnte für pOD 13 ein Abfall auf 10 % des Referenzwertes gemessen werden und für pOD 19 ein Anstieg um 23 % (Tab. 3.1).

Besonders auffällig waren die Konstrukte pOD 4 und pOD 8, die mit nur 5% des Referenzkonstrukts pOD 1 eine sehr niedrige Initiationseffizienz aufwiesen (Tab. 3.1). Beide Konstrukte enthielten zwei Translationsinitiationsstellen mit darauf folgenden Stopcodons, folglich einen nicht kodierenden ORF. Eine sehr hohe Translationsinitiationseffizienz zeigten hingegen die Konstrukte pOD 15 und 22. Diese enthielten ebenfalls mehrere Translationsinitiationsstellen, jedoch ohne Stopcodons und somit mit multiplen potentiellen Startpunkten der Translation, und erreichten das 15fache bzw. 71fache des Referenzwertes von pOD 1. Trotz der teilweise stark verringerten gfp-Transkriptmenge im Vergleich zum Referenzkonstrukt, konnte eine erhöhte GFP-Menge verglichen mit pOD 1 ermittelt werden. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass vollständige Translationsinitiationsstellen im Durchschnitt zu einer höheren Initiationseffizienz führten als isolierte SD-Sequenzen.

#### 3.5.2 Einfluss der SD-Sequenz-Varianten auf die Translationseffizienz in Plastiden in *N. tabacum*

0,71

0,36

0,67

0,01

0,19

0,47

1,07

0,90

pOD 2, 3

pOD 4, 5

pOD 6, 7

pOD 8, 9

pOD 11, 12

pOD 14, 15

pOD 17, 18

pOD 20,21

nsplastomischen Ta	abaklınıen.		
	Name	Effizienz	relative Veränderung
		2 SD  3 SD	

 $0,\!68$ 

0,36

0,20

0.02

2,96

0.40

1.62

 $1,\!32$ 

0,95

1

 $\mathbf{2}$ 

0,3

15,6

0,85

1,5

1,46

Tabelle 3.7: Translationsinitiationseffizienz in Abhängigkeit der Anzahl der SD-Sequenzen in verschiedenen transplastomischen Tabaklinien.

Die Translationsinitiationseffizienz in Chloroplasten von *N. tabacum* (Tab. 3.3) zeigte deutlich geringere Schwankungen im Vergleich zu *E. coli*. Es kam zu einer maximalen Zunahme der Initiationseffizienz auf das 3fache in pOD 12 im Vergleich zu pOD 1.

Sinkende Translationsinitiationseffizienzen konnten für Konstrukte mit multiplen SD-Sequenzen ermittelt werden. Für pOD 2 und pOD 3, mit 39 nt Abstand zwischen den SD-Sequenzen, konnte eine Reduktion der Initiationseffizienz um 5% (Tab. 3.7) ermittelt werden. Die Konstrukte mit direkter Wiederholung der SD-Sequenzen (pOD 6 und 7 Abb. 3.1) zeigten eine deutlichere Verringerung der Initiationseffizienz auf 30%.

Im Gegensatz dazu führten ORFs in der 5'UTR der Konstrukte pOD 4 und pOD 5 zu einer gleichbleibenden Effizienz im Vergleich beider Konstrukte zueinander. Demgegenüber stand die Verdopplung der Effizienz in pOD 9 im Vergleich zu pOD 8 (Tab. 3.7). Diese konnte jedoch auf Grund der geringen Proteinmenge (Tab. 3.3) nicht zuverlässig bestimmt werden. Konstrukte mit vervielfachten Translationsinitiationsstellen in einem Abstand von 39 nt zeigten ebenfalls keinen klaren Trend. In den Konstrukten mit Peptidaseschnittstelle (pOD 14 und 15) wurde ein Abfall der Initiationseffizienz um 15% im Vergleich beider Konstrukte miteinander, wohingegen das Konstrukt pOD 20 im Vergleich zu pOD 21 zu einer Zunahme der Effizienz um 46% führte (Tab. 3.7). Eine höhere Zahl direkt aufeinander folgender Translationsinitiationsstellen führte im Konstrukt pOD 12 verglichen mit pOD 11 zu einer sehr starken Erhöhung der Initiationseffizienz auf das 15fache. Für pOD 17 und 18 lag die Erhöhung der Effizienz mit 50%im Vergleich der Konstrukte miteinander deutlich geringer.

Wurden Konstrukte mit einer SD-Sequenz ähnlich zu pOD 1 betrachtet, konnten sehr starke Veränderungen in der Initiationseffizienz gemessen werden. So konnte für pOD 13 bedingt durch die geringe Proteinmenge keine Initiationseffizienz berechnet werden. Ebenso erreichte pOD 19 einen geringen Wert von 46 % im Vergleich zum Referenzkonstrukt (Tab. 3.3). Im Vergleich zum Referenzkonstrukt pOD 1 konnten zwei Konstrukte identifiziert werden, die eine deutlich erhöhte Initiationseffizienz zeigten. Beide Konstrukte (pOD 12 und 18) enthielten drei Translationsinitiationsstellen, die direkt aufeinander folgten. Sie erreichten eine Initiationseffizienz von 300 % bzw. 160 % im Vergleich zu pOD 1.

#### 3.5.3 Vergleich der Ergebnisse beider Organismen auf Ebene der Translation und der Translationseffizienz

#### Vergleich der GFP-Akkumulation in E. coli und Plastiden von N. tabacum

Die Proteinakkumulation konnte für E. coli und Plastiden von N. tabacum bestimmt werden. Im Vergleich der beiden Organismen zeigten sich Ähnlichkeiten in den Mustern der Proteinmengen des Reporterproteins GFP, wurden die Veränderungen in Bezug zur Anzahl der SD-Sequenzen gesetzt. Für Konstrukte mit einer Vervielfältigung von SD-Sequenzen, die direkt aufeinander folgten (pOD 6 und 7), konnte in beiden Organismen ein Anstieg der Proteinakkumulation im Vergleich beider Konstrukte zueinander ermittelt werden (Tab. 3.1 und 3.3). Wurde ein Abstand von 39 nt (pOD 2 und 3) zwischen die SD-Sequenzen eingefügt, ergab sich keine Übereinstimmung im Veränderungsmuster. So zeigte E. coli eine unveränderte Proteinmenge im Vergleich pOD 2 zu 3, wohingegen die Proteinmenge in N. tabacum eine Abnahme um 18 % erfuhr. Konstrukte, die kleine ORFs in der 5'UTR enthielten, akkumulierte in E. coli das Konstrukt pOD 4 ähnliche GFP-Mengen wie 5. Gleiches galt für pOD 8 und 9 (Tab. 3.1). Konstrukte mit nichtkodierenden ORFs in der 5' UTR führten jedoch in Tabak zu einer Abnahme der Proteinmenge im Vergleich der beiden Konstrukte zueinander, wohingegen die Konstrukte pOD 8 und 9 mit ORFs, die ein Glycincodon enthielten, ebenfalls verglichen zueinander eine gleich bleibende GFP-Akkumulation zeigten (Tab. 3.3). Die Veränderungen für alle weiteren Konstrukte (pOD 11 - 18) korrelierten in Tabak und E. coli, mit Ausnahme der Konstrukte pOD 20 und 21. Hier zeigte sich für *E. coli* eine Zunahme der GFP-Menge mit steigender Anzahl der SD-Sequenzen, wohingegen es in N. tabacum zu einer Verringerung der GFP-Akkumulation kam.

## Translationseffizienz in *E. coli* und Plastiden von *N. tabacum* in Abhängigkeit von SD-Sequenz-Varianten

In beiden untersuchten Organismen konnte mit Hilfe von Western- und Northern-Blots die Translationseffizienz der Konstrukte bestimmt werden. Auf der Ebene der Translationsinitiationseffizienz zeigten die beiden untersuchten Organismen deutliche Unterschiede in ihrem Verhalten bezüglich der Nutzung der SD-Sequenzen und Translationsinitiationsstellen.

Bei den Konstrukten, die eine Vervielfältigung der SD-Sequenzen enthielten, konnte für N. tabacum eine Verringerung der Effizienz im Vergleich des Konstrukts mit zwei SD-

Sequenzen zu dem mit drei SD-Sequenzen beobachtet werden (pOD 6 und 7 in Tab. 3.3). Für E. coli wurde eine gleich bleibende Effizienz bei steigender Anzahl an SD-Sequenzen ermittelt (Tab. 3.1). Wurde ein Abstand von 39 nt zwischen die SD-Sequenzen eingefügt (pOD 2 und 3), konnte für E. coli eine Zunahme der Initiationseffizienz und für Tabak-Chloroplasten eine leicht abfallende Effizienz im Vergleich der Konstrukte miteinander ermittelt werden. Für Konstrukte, die polycistronische Transkripte nachbildeten, wurden ebenfalls unterschiedliche Ergebnisse ermittelt. So erreichten die Konstrukte pOD 4 und pOD 5 mit nichtkodierenden ORFs in *E. coli* eine Steigerung der Effizienz im Vergleich beider Konstrukte miteinander (Tab. 3.1), wohingegen in Tabak ein gleich bleibendes Ergebnis errechnet wurde (Tab. 3.3). Das Konstrukt pOD 9 im Vergleich zu pOD 8 erzielte in E. coli ebenfalls eine Steigerung der Initiationseffizienz (Tab. 3.1). In Tabak konnte für diese Konstrukte zwar ebenfalls eine Steigerung der Effizienz ermittelt werden, jedoch basierte diese auf sehr geringen Werten und war folglich mit überproportional großen Fehlern behaftet. Der Einfluss eines Elongationsschritts in den Konstrukten pOD 8 und 9 war in N. tabacum deutlich stärker ausgeprägt als in E. coli. Die Konstrukte mit kleinen ORFs (pOD 4 und 5 sowie pOD 8 und 9) erzielten in E. coli ähnliche Raten der Translationseffizienz, wohingegen die Translationseffizienz in N. tabacum deutlich geringer war.

Für Konstrukte mit vollständigen Translationsinitiationsstellen ohne Stopcodons wurden ebenfalls unterschiedliche Ergebnisse für *E. coli* und *N. tabacum* errechnet. So stieg die Effizienz in Konstrukten mit 41 nt Abstand zwischen den SD-Sequenzen mit TEV-Erkennungsstelle in *E. coli* mit Zunahme der Anzahl der SD-Sequenzen an. In Konstrukten ohne die Peptidaseschnittstelle (pOD 20 und 21) wurde eine Verringerung der Effizienz im Vergleich der Konstrukte miteinander ermittelt. In *N. tabacum* konnte ein gegenteiliges Ergebnis ermittelt werden, da es hier für erstgenannte Konstrukte zu einer Verringerung und für letztgenannte Konstrukte zu einer Steigerung der Initiationseffizienz kam.

Konstrukte, die direkt aufeinander folgende Translationsinitiationsstellen enthielten, zeigten für pOD 11 im Vergleich zu pOD 12 in *E. coli* eine Abnahme und in *N. tabacum* eine Zunahme der Effizienz. pOD 17 und 18 resultierten als einzige Konstruktreihe in beiden Organismen in einem ähnlichen Verhalten. So konnten für diese Konstrukte sowohl in *E. coli* als auch in *N. tabacum* eine höhere Translationseffizienz im Vergleich pOD 17 zu 18 ermittelt werden.

Die Nutzung der SD-Sequenzen in Konstrukten mit multiplen Translationsinitiationsstellen unterschied sich zwischen *E. coli* und *N. tabacum*. So wurden in *E. coli* für alle SD-Sequenzen entsprechende GFP-Varianten detektiert (Konstrukte pOD 14-22, Tab. 3.2). In *N. tabacum* konnte jedoch eine starke Abnahme der GFP-Akkumulation für die GFP-Varianten detektiert werden, die aus der Nutzung der strangabwärts gelegenen – dem *gfp* zugewandten – Ribosomenbindestelle resultierten. Dies führte in den Konstrukten pOD 14 und 21 zu keiner bzw. kaum messbarer Translationseffizienz für die 3' gelegene SD-Sequenz (Tab. 3.4).

### 3.6 Untersuchung der Ribosomenbeladung des *gfp*-Transkripts in *N. tabacum*



pOD8 - Puromycin

Abbildung 3.10: Verteilung der gfp-mRNA in Dichtegradienten. Die Gradientenstufen verlaufen von geringer (1) bis hoher (15) Dichte. Die Einwanderung in Bereiche höherer Dichte deutete auf eine höhere Anzahl von gebundenen Ribosomen am gfp-Transkript hin. Mit Hilfe von Puromycin (pOD 8-Puromycin) wurden die Ribosomen vollständig von der mRNA getrennt. Freie mRNA dringt nur in die ersten Gradientenschichten ein. Der Nachweis erfolgte mittels Northern-Blot mit einer gfp-spezifischen Sonde.

Als Polysomen werden mit Ribosomen beladene mRNA-Moleküle bezeichnet. Eine höhere Ribosomenkonzentration auf der mRNA lässt auf eine stärkere Translation dieser schließen. Durch die Beladung der RNA mit Ribosomen erhöht sich die Dichte der Partikel. Die Partikel unterschiedlicher Dichte können mit Hilfe von Dichtegradientenzentrifugation aufgetrennt werden (2.13). In dieser Arbeit wurden transplastomische Pflanzen der Konstrukte pOD 8 und pOD 18 ausgewählt, um den ermittelten Unterschied in der Translationsinitiationseffizienz auf der Ebene der Ribosomenbeladung des gfp-Transkripts zu bestätigen. Diese beiden Konstrukte zeigten eine ähnliche gfp-Transkriptakkumulation, jedoch eine deutlich unterschiedliche Proteinakkumulation: pOD 18 führte zu einer 200fachen Proteinakkumulation und 160fachen Translationseffizienz im Vergleich zu pOD 8 (Tab. 3.3 (S. 59)).

Die Proben wurden aufbereitet (Kap. 2.13) und anschließend einer Dichtegradientenzentrifugation unterzogen. Darauf folgend wurden die Dichtegradienten wie in Kapitel 2.13 beschrieben in 15 Fraktionen aufgeteilt. Nach RNA-Isolation und Auftrennung dieser in denaturierenden Agarosegelen, wurde eine Northern-Blot-Hybridisierung durchgeführt, die in Abbildung 3.10 dargestellt wurde.

Die Region des Saccharosegradienten bis Fraktion 5 konnte nach Inkubation einer Polysomenisolation mit Puromycin – einem Translationsinhibitor, der die Dissoziation der Ribosomen von der mRNA bewirkt – als der Bereich, der freie mRNA enthält, identifiziert werden. Es zeigte sich, dass gfp-Transkripte, die vom Konstrukt pOD 18 gebildet wurden, in Regionen hoher Dichte des Saccharosegradienten eindrangen. Für dieses Konstrukt konnten Signale bis in die Fraktion 11 detektiert werden. Dies war ein Anzeichen für eine hohe Ribosomenbeladung der gfp-mRNA. Der Hauptanteil der gfp-Transkripte des Konstrukts pOD 8 drang lediglich in die oberen Schichten (bis Fraktion 5) des Saccharosegradienten ein. Die geringere Dichte der Transkripte ließ auf eine geringe Beladung der gfp-Transkripte mit Ribosomen schließen.

In Übereinstimmung mit den ermittelten Werten für die Translationsinitiationseffizienz beider Konstrukte (Tab. 3.3) konnte eine stärkere Ribosomenbeladung der *gfp*-Transkripte des Konstrukts pOD 18 im Vergleich zu denen des Konstrukts pOD 8 ermittelt werden.
# 3.7 Sequenzierung von Plastidengenomen der Gattung *Pelargonium*

In Hybriden aus verschiedenen Arten der Gattung *Pelargonium* tritt das Phänomen der Bastardbleichheit auf (Börner *et al.*, 1973; Metzlaff, 1980; 1983; Pohlheim, 1986). Unter anderem kann dieser Phänotyp in Hybriden aus *P. roseum* und *P. zonale* cv. Trautlieb sowie *P. zonale* cv. Stadt Bern beobachtet werden, jedoch nicht in Hybriden zwischen *P. zonale* cv. Trautlieb und *P. zonale* cv. Stadt Bern. Aus diesem Grund sind Unterschiede zwischen den Plastidengenomen von *P. roseum* und *P. zonale* besonders interessant. Die Bildung bleichen Blattmaterials zeigt sich unter Schwach- und Starklicht während der gesamten Blattentwicklung (Abb. 1.3). Es kommt also nicht zu einer langsamen Ausbleichung unter Lichteinfluss.

#### 3.7.1 Isolation von Chloroplasten und Plastiden-DNA

Das in Metzlaff (1983) beschriebene Isolationsprotokoll für intakte Chloroplasten wurde an die untersuchten Kultivare angepasst und wie in 2.14 durchgeführt. Die Isolation beruht auf dem Prinzip der differenziellen Zentrifugation. Nach Sedimentierung eines großen Anteils der Chloroplasten (s. Kap. 2.14) wurden diese auf einen Saccharosegradienten aufgetragen und intakte von beschädigten Plastiden getrennt (Abb. 3.11). Beschädigte Chloroplasten sammelten sich an der Grenzschicht 30 %-45 %, wohingegen intakte Chloroplasten aufgrund ihrer höheren Dichte bis zur 45 %-60 %-Grenzschicht vordrangen.

Nach erfolgter DNA-Isolation (2.8.1) konnte auf Kontamination nukleärer DNA getestet werden. Hierfür wurde ein Teil der isolierten DNA mit *Dra*I geschnitten. Nukleäre DNA zeigte sich nach Auftrennung des Restriktionsansatzes durch die große Anzahl von Erkennungsstellen für *Dra*I als fluoreszierender Hintergrund über die gesamte Trennstrecke des Agarosegels. Plastiden-DNA konnte aufgrund der geringeren Anzahl von *Dra*I-Erkennungsstellen als distinktes Bandenmuster erkannt werden (Abb. 3.12). Eine vollständige Entfernung nukleärer Kontaminationen ist generell nicht möglich (Jansen *et al.*, 2005; Metzlaff, 1980).

Zur Sequenzierung konnten die 45 %-60 %-Fraktion des Saccharosegradienten von Trautlieb (Abb. 3.12 **A** Spur 2), die 30 %-45 %-Fraktion von Stadt Bern (Abb. 3.12 **B** Spur 1) und die 30 %-45 %-Fraktion von Roseum (Abb. 3.12 **C** Spur 1) genutzt werden. Die genannten Proben zeigten eine für eine Sequenzierung ausreichende Reinheit. Die Sequenzierung der Plastidengenome konnte auf dieser Basis erfolgreich durchgeführt werden.

#### 3.7.2 Sequenz der Pelargonium-Plastidengenome

Die Sequenzierung, die durch die Firma Genterprise (Mainz) durchgeführt wurde, basierte auf 6-8  $\mu$ g DNA. Die DNA wurde mechanisch geschert und anschließend auf einem Aga-



Abbildung 3.11: Chloroplastenisolation mit Hilfe eines Saccharosestufengradienten. Intakte Chloroplasten befanden sich an der unteren Grenzschicht des Gradienten (45 %-60 %), beschädigte an der oberen Grenzschicht (30 %-45 %) und Zellbruchstücke sowie intakte Zellen im Sediment.



Abbildung 3.12: Aufgetrennte Restriktionsansätze isolierter Plastiden-DNA.

Die DNA aus Chloroplasten von *Pelargonium* Kultivaren wurden mit Hilfe eines *Dra*I-Verdaus auf Kontamination mit Kern-DNA getestet. Die mit Ethidiumbromid gefärbte DNA zeigte ein deutliches Bandenmuster für **A**-*Pelargonium zonale* cv. Trautlieb, **B**-*Pelargonium zonale* cv. Stadt Bern, **C**-*P. roseum* und einen "Schmier" im Hintergrund, der von nukleärer DNA verursacht wurde. **A** M-1kb Größenstandard (Fermentas), 1–DNA aus beschädigten Chloroplasten der 30%-45%-Grenzschicht des Saccharosegradienten, 2–DNA aus intakten Chloroplasten der 45%-60%-Grenzschicht, 3–6000 g Fraktion (Kap. 2.14); **B** 1–DNA aus Chloroplasten der 30%-45%-Grenzschicht, 2–DNA aus Chloroplasten der 45%-60%-Grenzschicht, 3–6000 g Fraktion; **C** 1–DNA aus Chloroplasten der 30%-45%-Grenzschicht, 2–DNA aus Chloroplasten der 45%-60%-Grenzschicht

rosegel aufgetrennt. Fraktionen, die 1,5-2,5 kb, 2,5-6 kb und >6 kb entsprachen, wurden in einen pUC19 Vektor eingefügt. In diesen Fraktionen lag der Anteil nukleärer DNA über den Erwartungen (Tab. 3.8), weshalb für eine erfolgreiche Sequenzierung eine große Anzahl von Sequenzierungsreaktionen durchgeführt werden musste.

Für die drei Plastidengenome von *P. zonale* cv. Trautlieb, *P. zonale* cv. Stadt Bern und *P. roseum* wurden 1068, 1180 bzw. 1907 Sequenzierungsreaktionen durchgeführt. Mit Hilfe dieser konnten große zusammenhängende Stücke der Plastidengenome zusammengesetzt werden. Die zusammenhängenden Fragmente überdeckten jedoch nicht die vollständige Plastidensequenz. Zum Schließen der Lücken wurden Oligonukleotide hergestellt und mittels PCR die fehlenden DNA-Stücke amplifiziert. Anschließend konnte über Primer-Walking die Sequenz der die Lücken überspannenden Amplifikate bestimmt werden. Hier-

	Anteil der nukleären Sequenzen (in %)				
	Trautlieb	Stadt Bern	$\operatorname{Roseum}$		
Fraktion 1,5-2,5 kb	45,8	19,4	48,4		
Fraktion 2,5-6 kb	46,8	$^{32,3}$	$44,\!8$		
${\rm Fraktion} > 6~{\rm kb}$	nicht getestet	100,0	$60,\!0$		

Tabelle 3.8:	Kontamination	$\operatorname{der}$	Chloroplasten	DNA	$\operatorname{mit}$	nukleärer	DNA
--------------	---------------	----------------------	---------------	-----	----------------------	-----------	-----

für wurden für *P. zonale* cv. Trautlieb, *P. zonale* cv. Stadt Bern und *P. roseum* 117, 111 bzw. 125 Oligonukleotide hergestellt und 86, 65 bzw. 74 zusätzliche Sequenzierungsreaktionen durchgeführt.

Abschließend konnten die Plastidengenome zu zirkulären Molekülen zusammengesetzt werden. Ihre Länge betrug für Trautlieb, Stadt Bern und Roseum 217.821 bp, 217.948 bp bzw. 218.133 bp. Die Genome besaßen die gewöhnliche viergeteilte Struktur aus zwei Einzelregionen (LSC, SSC) und zwei invertierten Duplikationen (IR) (Abb. 3.13, A.21, A.23). Es ist jedoch auffällig, dass die invertierten Duplikationen im Vergleich zu den meisten publizierten Plastomen deutlich größer waren (Palmer *et al.*, 1987). Damit trugen sie wesentlich zur Zunahme der Molekülgröße von 120-160 kb auf 218 kb bei. Dies wurde bereits in einem anderen Kultivar von *Pelargonium zonale* (Chumley *et al.*, 2006) beobachtet. Im Vergleich zur publizierten Sequenz des *Pelargonium zonale* cv. Ringo White-Plastoms konnte der gleiche Gengehalt festgestellt werden. Dies schloss ebenfalls das Fehlen eindeutig identifizierbarer Gene für rpoA, trnT-GGU und accD (Tab. 3.9) ein.

Genfunktion	Gene			
Photosynthesegene				
Photosystem I-Untereinheiten	psaA, psaB, psaC, psaI, psaJ			
${\rm Photosystem}  {\rm I-Assemblierungs faktoren}$	ycf3, ycf4			
Photosystem II-Untereinheiten	psbA, psbB, psbC, psbD, psbE, psbF, psbH, psbI, psbJ, psbK, psbL, psbM, psbN, psbT, psbZ			
$Cytochrom b_6f$ -Untereinheiten	$petA, \ petB, \ petD, \ petG, \ petL, \ petN$			
ATP Synthase-Untereinheiten	atpA, atpB, atpE, atpF, atpH, atpI			
NAD(P)H Dehydrogenase-Untereinheiter	ndhA, ndhB, ndhC, ndhD, ndhE, ndhF, ndhG, nd- hH, ndhI, ndhI, ndhK			
RuBisCO	rbcL			
Gene des genetischen Systems				
	trnA-UGC, trnC-GCA, trnD-GUC, trnE-UUC,			
	trnF-GAA, trnfM-CAU, trnG-GCC, trnG-UCC,			
+ DNA a	trnH-GUG, $trnI$ -UAU, $trnI$ -GAU, $trnK$ -UUU,			
UNIVAS	trnL-UAA, $trnL$ -UAA, $trnL$ -UAG, $trnM$ -UAU, trnN GIII $trnP$ IICC $trnO$ IIIC $trnR$ ACC			
	trnR-UCU, trnS-GCU, trnS-GGA, trnS-UGA,			
	trnT-UGU, $trnV$ -GAC, $trnV$ -UAC, $trnW$ -CCA,			
	trnY-GUA			
m rRNAs	rrn4,5, rrn5, rrn16, rrn23			
Ribosomen-Untereinheiten~(30S)	rps2, rps3, rps4, rps7, rps8, rps11, rps12, rps14, rps15, rps16, rps18, rps19			
Ribosomen-Untereinheiten $(50S)$	rpl2, rpl14, rpl16, rpl20, rpl22, rpl23, rpl32, rpl33, rpl36			
plastidenkodierte RNA Polymerase	rpoB, rpoC1, rpoC2			
Spleißfaktor	matK			
Proteinabbau	clpP			
andere Gene und Gene unbekannter	r Funktion			
$\rm CO_2$ -Aufnahme	cemA			
Ham-Bindung konservierte OPE	CCSA weft_wef0			
Konservierte OKF	ycj1, ycjz			
fehlende Gene im Vergleich zum ko	nservierten Angiospermensatz			
Acetyl-CoA-Carboxylase-Untereinheit				
trina plastidankodiarta RNA Polymerasa	tTnI - GGU			
plasticenkoulerte INIA i orymetase	I POA			

Tabelle 3.9: Zusammenfassung der plastomkodierten Gene



Abbildung 3.13: Physische Karte des Plastidengenoms von *Pelargonium roseum*. Gene innerhalb des Hauptkreises werden im Uhrzeigersinn, die außerhalb entgegengesetzt transkribiert. Der innere Kreis markiert die Position der invertierten Duplikationen (IR) und der Einzelregionen (SSC, LSC). Die Darstellung wurde mit OGDraw (Lohse *et al.*, 2007, Kap. 3.7.3) erzeugt.

#### 3.7.3 Vergleich von vier Pelargonium-Plastidengenomen

Die in dieser Arbeit vorgestellten Genomvergleiche wurden mit Hilfe folgender Programme durchgeführt: blast2seq (Tatusova und Madden, 1999), clustalW (Larkin *et al.*, 2007) und Dialign (Brudno *et al.*, 2004). Vergleiche auf Ebene der kodierenden Sequenzen wurden unter Zuhilfenahme von Perl Skripten durchgeführt, wobei Methoden aus dem Bio::Perl-Modul (http://www.bioperl.org) genutzt wurden.

#### Eigenschaften der untersuchten Plastidengenome

Die nachfolgende Untersuchung umfasste die drei im Rahmen dieser Arbeit sequenzierten Plastome. Zusätzlich konnten einige Vergleiche mit einem weiteren verfügbaren Pelargonium zonale-Plastom angestellt werden. Dies wurde von Chumley et al. (2006) publiziert und behandelt die Sequenz von P. zonale cv. Ringo White. In Tabelle 3.10 sind grundlegende Eigenschaften der untersuchten Plastome aufgeführt. Für Ringo White musste ein Mittelwert für die Länge der IR ermittelt werden, da diese in der publizierten Sequenz eine Differenz von 14 nt aufwiesen. Die Sequenzunterschiede und der hohe Grad an Reorganisation des Plastoms im Vergleich zu anderen Angiospermen-Plastomen wurde in Chumley et al. (2006) behandelt. Eine derartige Untersuchung war nicht Gegenstand dieser Arbeit. Im Vergleich der untersuchten Sequenzen zeigten sich Größenunterschiede der Plastome. Dies ließ sich im Fall der *P. zonale*-Varietäten auf Unterschiede in der Größe der LSC zurückführen. Die deutliche Vergrößerung des P. roseum-Plastoms beruhte auf der Expansion der LSC und der IR, wobei die geringere Länge der SSC kompensiert wurde. Der beobachtete Größenunterschied der untersuchten Genome beruhte auf der Expansion der intergenischen Bereiche (Tab. 3.10). Eine Erhöhung der Genzahl konnte nicht festgestellt werden. Der AT-Gehalt der Genome war in den untersuchten Regionen in allen vier untersuchten Plastomen ähnlich.

Der Gengehalt der untersuchten Plastome war mit 76 proteinkodierenden Genen gleich. Von diesen lagen 39 innerhalb der invertierten Duplikationen. Zusätzlich befanden sich 29 tRNA-Gene und 4 rRNA-Gene im Genom, wovon 9 tRNA-Gene durch ihre Lage im IR dupliziert vorlagen. Die untersuchten Plastome enthielten, wie das publizierte Genom, eine Vielzahl an Pseudogenen, die auf die Reorganisation des Plastoms zurückgeführt werden konnten (Chumley *et al.*, 2006). Die Untersuchung der Codonhäufigkeiten (Tab. A.2) ergab zwischen den Plastomen von *Pelargonium spec.* keine Unterschiede. Hierbei fiel auf, dass trotz fehlender *trnT*-GGU im Vergleich zum Tabak-Plastidengenom keine Verringerung der Häufigkeit der von *trnT*-GGU dekodierten Codons festgestellt werden konnte. In Tabak sowie *Pelargonium* konnte ein Codongehalt von ca. 1% (ACC) bzw. 2% (ACT) ermittelt werden.

	<i>P. zonale</i> cy. Trautlieb	P. zonale cv. Stadt Bern	P. roseum	P. zonale
	ett fraumes	off Statt Born		
Genomgröße (bp)				
$\operatorname{gesamt}$	217.821	217.948	218.133	217.942
LSC	59.687	59.712	59.844	59.710
$\mathbf{SSC}$	6.748	6.752	6.625	6.752
IR	75.743	75.742	75.832	75.740
				1
$\mathbf{Nukleotidanteil} \ (\ \%)$				
kodierende Regionen	60,78	59,75	$57,\!15$	56,66
Intron	9,38	9,37	9,74	9,31
intergenische Regionen	29,84	30,88	$33,\!11$	34,03
				I
$\mathbf{AT-Gehalt} \ (\%)$				
gesamt	$60,\!38$	60,39	$60,\!43$	60,39
kodierende Regionen	58,75	$58,\!69$	$58,\!81$	58,70
tRNA	$46,\!37$	47,18	46,36	46,49
m rRNA	45,91	45,90	45,86	45,91
Protein kodierende Gene	60,08	$60,\!13$	60,24	60,16
LSC	61,71	61,73	$61,\!86$	61,73
SSC	65.97	66,00	65.83	66.01
IR	$59,\!61$	$59,\!61$	$59,\!64$	59,62
	/	/	/	1 2

Tabelle 3.10: Eigenschaften der vier untersuchten Pelargonium spec.-Plastome.

#### Konservierung der offenen Leserahmen (ORF)

Die Konservierung der offenen Leseraster stellte ein wichtiges Kriterium zur Untersuchung der Bastardbleichheit dar. Einzelnukleotidaustausche könnten einen Einfluss auf die Aminosäuresequenz haben und somit Einfluss auf die Proteinfunktion nehmen. Dies bildet eine mögliche Grundlage für die beobachtete Bastardbleichheit.

Im Gegensatz hierzu befanden sich eine Vielzahl von Mutationen auf Nukleotidebene in den kodierenden Regionen im Vergleich von *P. zonale* mit *P. roseum* (Tab. A.1), die zum Teil einen Effekt auf die Aminosäuresequenz zur Folge hatten.

Gene des genetischen Systems zeigten eine Häufung von Mutationen (Tab. 3.11). Im Vergleich Stadt Bern/ Trautlieb gegenüber P. roseum zeigten sich zahlreiche Mutationen in Genen, deren Produkte am Aufbau der großen (rpl) und kleinen (rps) Untereinheit der Ribosomen beteiligt waren. Für beide Untereinheiten konnten acht bzw. sechs mutierte Gene identifiziert werden. Außerordentlich stark betroffen waren die Gene, deren Genprodukte Untereinheiten der plastidenkodierten RNA-Polymerase darstellten. Hier wurden sowohl zahlreiche Nukleotidsubstitutionen als auch Insertionen und Deletionen gefunden. Die Insertion in rpoC1 ( siehe Tab. 3.11) stellte eine Duplikation der Sequenz CGTACTGAAin P. roseum im Vergleich zu Stadt Bern und Trautlieb dar. Im gleichen Gen befand sich ebenso eine Deletion im Vergleich zur Referenz P. roseum. Hier konnte erkannt werden, dass im Plastom von Stadt Bern und Trautlieb ein kurzes Motiv GGGATC vervierfacht wurde. Ein Element war jedoch bereits durch Mutationen leicht abgeändert. Es war auffällig, dass diese Insertionen und Deletionen das Leseraster des Gens nicht beeinflussten. Zusätzliche Längenpolymorphismen traten in den Genen rpoB (Deletion) und rpoC2 (Insertion) auf.

Im gesamten Genom konnte keine Sequenz dem Gen rpoA eindeutig zugeordnet werden. Zwei Fragmente homologer Sequenzen konnten nach Protein-DNA Vergleichen (blastp) in drei offenen Leserahmen ermittelt werden. Hierbei war eine lange und eine verkürzte Homologe Region erkennbar, wobei die kürzere einen Teil der längeren darstellte. Die zu rpoA homologen Sequenzen traten in den einzelnen offenen Leserahmen nicht zusammenhängend auf. Es war jedoch zu beobachten, dass sie im gleichen Leseraster lagen. Die Homologie zur Proteinsequenz, die in Tabak ermittelt wurde, beträgt für die Fragmente maximal 36 % bis 39 %. Die Homologie zur  $\alpha$ -Untereinheit der RNA-Polymerase in *E. coli* beträgt nur maximal 21 % bis 23 %. Die beiden ermittelten Fragmente mit dem höchsten Grad an Konservierung wurden innerhalb der drei ermittelten offenen Leseraster als Pseudogene annotiert und die gesamten offenen Leserahmen als *ORF553*, *ORF623* und *ORF628 (P. roseum*) bezeichnet. *ORF553* wurde auf Grund einer Insertion in Stadt Bern und Trautlieb als *ORF555* bezeichnet. Sequenzvergleiche der offenen Leserahmen mit der nichtredundanten Datenbank des NCBI ("National Center for Biotechnology Information") ergaben außer der Ähnlichkeit mit rpoA keine weiteren Homologien.

Eine Verkürzung wurde in rps4 beobachtet. Diese beruhte nicht auf einer Deletion, sondern auf einer Mutation  $C \rightarrow A$ , wodurch ein Stopcodon generiert wurde. Die größte Veränderung eines Gens betraf das offene Leseraster unbekannter Funktion ycf1. Dieses Gen ist im Vergleich zu anderen Angiospermen wie Tabak oder Tomate wenig konserviert und konnte nur durch Genomvergleiche auf Proteinebene zugeordnet werden. Der Vergleich der Sequenz in *P. roseum* mit den anderen beiden untersuchten Plastomen zeigte eine Insertion in *P. roseum*. Hierbei handelte es sich um eine Duplikation von 33 nt (*CTC GAA GAG GAA GAG AAT CAA GAA ATT TTG GAT*), die wie alle anderen Insertionen und Deletionen das Leseraster nicht veränderte.

Besonders auffällig ist die geringe Anzahl an Mutationen im Vergleich der Plastidengenome von *P. zonale* cv. Stadt Bern und *P. zonale* cv. Trautlieb, die zwei Kultivare der Art *P. zonale* darstellen. Innerhalb der kodierenden Bereiche konnten ausschließlich stille Mutationen in den Genen matK, psaA und rpoC2 festgestellt werden (Tab. 3.11). Insertionen oder Deletionen in den kodierenden Regionen konnten in kodierenden Regionen konnten im Vergleich der beiden Kultivare miteinander nicht festgestellt werden.

#### Insertionen und Deletionen in den Plastidengenomen

Der Vergleich der in Rahmen dieser Arbeit sequenzierten Plastidengenome zeigte, dass sich die Genome deutlich in ihrer Länge unterscheiden (Tab. 3.10). Detaillierter wurden diese Befunde auf die vier Bereiche der Plastomstruktur (IR, SSC, LSC) aufgeschlüsselt. Grundlage dieser Längenunterschiede war das Vorhandensein von Insertionen und De-



Abbildung 3.14: Die größten Insertionen im Vergleich P. roseum (A) mit P. zonale cv. Trautlieb (B) befanden sich im LSC-Region in der Region zwischen den Genen rps14 und psbD.

letionen im Vergleich der Plastidengenome von Trautlieb und Stadt Bern zum Plastom von P. roseum. Diese traten hauptsächlich in intergenischen Regionen der Plastome auf (Tab. 3.12). Insertionen und Deletionen, die in kodierenden Bereichen auftraten, sind zusammen mit ihren Konsequenzen auf die Aminosäuresequenz in Tabelle 3.11 aufgeführt. Insertionen und Deletionen traten in ungefähr gleichem Verhältnis auf. Die Mehrzahl dieser Mutationen befand sich in den intergenischen Bereichen der untersuchten Plastome. Die intergenischen Bereiche stellten in Trautlieb nur einen Sequenzanteil von 29,8 %, wohingegen sich 82,8 % der Mutationen in diesen Bereichen befanden. Hauptsächlich handelte es sich bei den Insertionen und Deletionen um kurze Nukleotidabschnitte bis hinab zu einem Nukleotid. Eine geringe Anzahl von Mutationen betraf jedoch einen größeren Nukleotidbereich. So konnten im Vergleich *P. roseum* mit *P. zonale* cv. Trautlieb Deletionen von 3 nt, 138 nt, 236 nt und 791 nt und eine Insertion von 1.141 nt identifiziert werden (Abb.3.14). Alle genannten Insertionen und Deletionen, sowie eine Vielzahl der kleineren Mutationen dieses Typs, befanden sich in der LSC-Region der untersuchten Plastome.

Die große Anzahl an Insertionen und Deletionen führte zusammen mit Einzelnukleotidaustauschen zu einer geringeren Konservierung der sequenzierten Plastidengenome im Vergleich zu bereits publizierten Plastomsequenzen, z.B. Solanum lycopersicum und S. tuberosum (Kahlau et al., 2006; Gargano et al., 2005). So zeigten die beiden publizierten Solanum-Genome eine Ähnlichkeit von 98,4 ("Similarity index", Martinez/Needlemann-Wunsch-Algorithmus), wohingegen beim Vergleich von P. roseum zu P. zonale cv. Trautlieb und P. zonale cv. Stadt Bern eine Ähnlichkeit von 98 bzw. 97,9 ermittelt wurde (MegAlign, DNAStar Burland (2000)). Der Vergleich von P. zonale cv. Trautlieb zu P. zonale cv. Stadt Bern lieferte einen Ähnlichkeitswert von 100, ein gerundeter Wert, da bei beiden Genomen Insertionen und Deletionen zu beobachten waren.

Kodierende Regionen enthielten im Vergleich zu ihrem Nukleotidanteil am Plastidengenom (Tab. 3.10) wenig Längenpolymorphismen, was auf eine hohe Konservierung dieser Bereiche schließen lässt. Nur in den Genen rpoB, rpoC1, rpoC2, ORF555 (*P. roseum* ORF553) und ycf1 konnten Längenpolymorphismen ermittelt werden (Kap. 3.7.3 Konservierung der offenen Leseraster). Das Gen rpoC1 fiel hier durch das Vorhandensein von zwei Mutationen auf (Tab. 3.12) und *ycf1* durch die Länge der Deletion von 33 nt im Vergleich *P. roseum* zu *P. zonale.* Die Mutation im ORF555 befand sich in einer Region, die Homologie zum Gen rpoA aufwies.

Nur wenige Insertionen und Deletionen befanden sich in den Introns, die in den untersuchten Plastomen vorhanden waren. Hierbei zeigten sich Mutationen in den Introns von *clpP*, *ndhA*, *trnK*-UUU und *ycf3*. Im Intron von *ndhA* befanden sich eine Insertion und eine Deletion in *P. zonale* im Vergleich zur Referenz *P. roseum*. Das Intron des Gens *trnK*-UUU enthielt im Vergleich zu *P. roseum* zwei Insertionen.

#### Identifikation von Kandidatengenen als Ursache der Bastardbleichheit

Der eingangs erwähnte stabile Phänotyp bleichen Blattmaterials auch in jungen Blättern ermöglicht nur eine geringe Anzahl von Kandidatengenen als ursächliche Gründe des beobachteten Phänotyps (Abb. 1.3). Hierzu zählen die Gene, deren Produkte am Aufbau der ATP-Synthase, der plastidenkodierten RNA-Polymerase oder der plastidären Ribosomen beteiligt sind (siehe Diskussion 4.2.3). In diesen Genen konnte eine Vielzahl an Nukleotidunterschieden identifiziert werden.

Durch die Vielzahl an Längenpolymorphismen fallen die Gene der RNA-Polymerase (rpo) auf. Diese zeigten zusätzlich eine große Zahl von Nukleotidaustauschen (Tab. 3.11). Zusätzlich konnten in den kodierenden Sequenzen der ribosomalen Proteine eine Reihe von Unterschieden identifiziert werden (Tab. 3.11). Es waren Gene betroffen, deren Produkte am Aufbau beider ribosomalen Untereinheiten beteiligt sind (rpl/rps). Die Klasse der *atp*-Gene zeigte ebenfalls eine Reihe von Nukleotidunterschieden zwischen *P. roseum P. zonale*. Diese bestanden aus Einzelnukleotidaustauschen in den Genen *atpA*, *atpB*, *atpF* und *atpH* (Tab. 3.11).

#### Herstellung eines Computerprogramms zur Visualisierung von Plastidengenomen

Die Zahl sequenzierter Plastidengenome hat in den letzten Jahren dramatisch zugenommen. Bisher war es nicht möglich, diese Genome als GenBank-Dateien in einem direkten und leicht zu bedienenden Arbeitsfluss bildlich darzustellen. Aus diesem Grund stellten sich der Autor dieser Arbeit und Marc Lohse die Aufgabe, ein entsprechendes Programm herzustellen.

Die Wahl der Programmiersprache zur Herstellung des Programms OGDraw fiel auf Perl, das für die Verarbeitung und Manipulation von Textinformationen alle notwendigen Funktionen enthält. Zur leichten Erreichbarkeit des Werkzeugs für externe Nutzer wurde das Programm als Webservice frei verfügbar angelegt (http://ogdraw.mpimpgolm.mpg.de). Hierfür generiert ein Perl/CGI Skript dynamisch Webseiten zur Steuerung des Programms. Außerdem sollte es möglich sein, das Programm in fremde Arbeitsabläufe oder Programme einzubinden. Um dies zu erreichen wurde OGDraw als modulares Programm mit Objekt-orientierter Ansteuerung verwirklicht. Als Eingabeformat der Daten fiel die Wahl auf das weit verbreitete GenBank-Format (http://www.ncbi.nlm.nih.gov). Dieses Format enthält Textinformationen als Schlüssel-Wert-Paare. Das Programm OGDraw (Lohse *et al.*, 2007) wurde so konzipiert, dass es diese Daten extrahiert und anschließend als Bild wiedergibt.

Nach Eingabe der annotierten Sequenzdaten werden diese prozessiert und eine Liste mit allen in der Datei gefundenen Annotationen angelegt. Hierfür kommt das Bio::Perl-Modul (http://www.bioperl.org) zum Einsatz, das eine ausgereifte Umgebung zur Bearbeitung und Verwaltung von annotierten Sequenzen zur Verfügung stellt. Einige Filter prozessieren die erstellte Liste, um Fehler in der Annotation auszugleichen. Hierzu zählen unter anderem unklare Annotationen des Gens rps12, dessen zwei Transkripte unter anderem trans-Spleißen zur Herstellung der reifen mRNA erfordern. Die rps12-Annotation als ein Transkript kann in einigen mangelhaft annotierten Genomen mit ca. 70 kb Länge einen Großteil des Plastidengenoms überdecken. Um dies zu vermeiden, werden die einzelnen Exons durch die Programmlogik extrahiert und ersetzen im Darstellungsprozess die Originalannotation. Ein weiterer Algorithmus verhindert Überlagerungen von kleinen Objekten durch größere, wie z.B. das im trnK-Intron liegende Gen matK (siehe 3.13).

Anschließend wird die Liste der Annotationen für den Darstellungsprozess aufgearbeitet. Hierfür werden die vom Benutzer eingestellten Werte genutzt, die die Darstellung weiter beeinflussten. So kann der Benutzer die Genklassen (z.B. Photosystem I), die dargestellten Restriktionsenzyme oder die Einblendung des Gehalts der Nukleotide G und C mit Hilfe eines GC-Graphen festlegen. Trifft der Benutzer keine Vorauswahl werden Standardwerte (abhängig vom Genom: Plastom, Chondriom) genutzt. In der finalen Abbildung werden Gene, deren Produkte zur Bildung eines Komplexes beitragen, so gleichfarbig dargestellt. Abschließend erfolgt die graphische Darstellung. Die Art der Darstellung ist abhängig vom Genomtyp der eingesetzten GenBank-Datei. Werde Daten angegeben, die als zirkuläres Genom annotiert sind, werden diese ebenso dargestellt. Einige Mitochondriengenome kartieren jedoch als lineare Genome. Dies ist obligatorisch in den entsprechenden Dateien so vermerkt und wird als lineare Karte umgesetzt. Eine lineare Karte wird ebenso gezeichnet, sollte vom Benutzer nur ein Ausschnitt des Genoms zur Darstellung angefordert werden. Die Ausgabe des Programms erfolgt temporär im Postscript(C)-Format mit Hilfe des Post-Script::Simple Moduls. Anschließend wandelt das Programm die Ausgabe mit Hilfe der ImageMagick Bibliotheken (http://www.imagemagick.org) nach Benutzerangaben in verschiedene Pixelbildformate um.

Das Programm wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht nur zur Darstellung der sequenzierten Plastome (Abb. 3.13 bzw. Abb. A.21 - Abb. A.23), sondern auch zur Fehlerprüfung während der Annotation, genutzt.

		Mutation		
Gen	P. roseum P. zonale cv. Trautlieb	P. roseum P. zonale cv. Stadt Bern	<i>P.z.</i> cv. TB <i>P.z.</i> cv. SB	Mutationen mit Konsequenz für die Aminosäuresequenz
atpA	2	2	0	1
atpB	3	3	0	1
atpF	2	2	0	2
atpH	1	1	0	0
ccsA	5	5	0	4
clpP	2	2	0	2
matK	7	8	1	6
ndhA	1	1	0	0
ndhD	2	2	0	1
ndhE	1	1	0	0
ndhG	2	2	0	2
ndhI	1	1	0	1
ndhJ	4	4	0	3
ndhK	1	1	0	0
psaA	0	1	1	0
psaB	3	3	0	2
psaC	1	1	0	0
psaI	1	1	0	1
psbA	1	1	0	0
psbK	1	1	0	1
rpl14	1	1	0	1
rpl16	1	1	0	1
rpl20	1	1	0	1
rpl22	1	1	0	1
rpl23	1	1	0	1
rpl32	2	2	0	1
rpl33	1	1	0	1
rpl36	1	1	0	1
rpoB	17 + 6 nt Deletion	$17+6\mathrm{nt}\mathrm{Deletion}$	0	$14\mathrm{AS}+2\mathrm{Deletion}$
rpoC1	23 + 24 nt Deletion $+ 9$ nt Insertion	23 + 24 nt Deletion $+ 9$ nt Insertion	0	22  AS + 8  Deletion + 3  Insertion
rpoC2	$egin{array}{llllllllllllllllllllllllllllllllllll$	$12 + 3  ext{ nt Insertion} + 6  ext{ nt aufeinanderfolgend}$	1	$egin{array}{llllllllllllllllllllllllllllllllllll$
rps2	1	1	0	0
rps4	$2 + 6  \mathrm{nt}$ Insertion	$2 + 6  \mathrm{nt}  \mathrm{Insertion}$	0	$2\mathrm{AS}+2\mathrm{Insertion}$
rps14	1	1	0	0
rps16	2	2	0	2
rps18	1	1	0	1
rps19	1	1	0	0
rrn16	2	2	0	
ycf1	33 nt Deletion	33 nt Deletion	0	11 Deletion
ycf2	4	4	0	4

Tabelle 3.11: Zusammenstellung der Mutationen in den untersuchten Plastomen von *P. roseum*, *P.z.* cv. Trautlieb (TB) und *P.z.* cv. Stadt Bern (SB). Angegeben ist die Anzahl an Nukleotidaustauschen, Insertionen und Deletionen. Eine detaillierte Zusammenstellung befindet sich in Tab. A.1

	<i>P. roseum</i> <i>P. zonale</i> cv. Trautlieb		P. roseum P. zonale cy. Stadt Bern		<i>P.z.</i> cv. Stadt Bern <i>P.z.</i> cv. Trautlieb	
	Deletionen	Insertionen	Deletionen	Insertionen	Deletionen	Insertionen
LSC						
$\operatorname{intergenische}$						
$\mathbf{B}$ ereiche	19	21	20	22	7	3
Introns	0	3	0	3	1	0
		trnK-UUU, ycf3		trnK-UUU, ycf3	trnK-UUU	
kodierende						
$\mathbf{B}$ ereiche	2	2	2	2	0	0
	rpoB, rpoC1	rpoC1, rpoC2	rpoB, rpoC1	rpoC1, rpoC2		
$\mathbf{SSC}$						
intergenische						
$\mathbf{\tilde{B}}$ ereiche	4	0	4	1	1	0
Introns	1	1	1	1	0	0
	ndhA	ndhA	ndhA	ndhA		
kodierende						
$\mathbf{Bereiche}$	0	0	0	0	0	0
IR						
intergenische						
$\stackrel{\circ}{\mathrm{B}}\mathrm{ereiche}$	5	9	5	8	1	1
Introns	0	1	0	1	0	0
		clpP		clpP		
kodierende		-		-		
Bereiche	1	1	1	1	0	0
	ycf1	ORF553	ycf1	ORF553		

Tabelle 3.12: Der Vergleich der drei untersuchten Plastome zeigte eine Reihe von Insertionen und Deletionen auf. Diese sind untergliedert nach den Einzelregionen und einer invertierten Duplikation aufgeführt.

## 4 Diskussion

## 4.1 Rolle von Shine-Dalgarno-Sequenzen in der Translationsinitiation in *E. coli* und Plastiden

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene SD-Sequenz-Varianten in E. coli und Plastiden von N. tabacum eingebracht (Kap. 3.2). Anschließend konnten vergleichende Untersuchungen zur Translationsinitiation in beiden prokaryotischen Systemen durchgeführt werden. Mit Hilfe der genannten Konstrukte konnte der Einfluss von SD-Sequenzen auf die Translationsinitiation untersucht werden. So wurde die Anzahl von SD-Sequenzen in der 5'UTR erhöht, um die Anzahl potentieller Ribosomenbindestellen zu erhöhen. Ahnliche Konstrukte steigerten potentiell durch die Vervielfältigung von SD-Sequenzen und Einfügen von Abständen zwischen diesen die Anzahl der Ribosomen an der 5'UTR. Weitere Konstrukte enthielten kleine ORFs in der 5'UTR und bildeten so polycistronische Transkripte nach. Hiermit wurde untersucht inwieweit Ribosomen aus E. coli und Tabakplastiden in der Lage sind, eine Reinitiation durchzuführen, nachdem sie einen Initiationskomplex bzw. einen Elongationskomplex an einem nichtkodierenden ORF bzw. einem glycinkodierenden ORF gebildet haben. Im Gegensatz zur Vervielfältigung von Ribosomenbindestellen wurden weitere Konstrukte mit vervielfältigten Translationsinitiationsstellen (SD-Sequenz und Startcodon) erstellt, um den Einfluss mehrerer Translationsstartpunkte auf die Translation zu untersuchen.

Um einen Einfluss der N-terminalen Aminosäure auf die Proteinakkumulation und insbesondere die Proteinstabilität auszuschließen, enthielten alle Konstrukte am 5' Ende der kodierenden Regionen, einschließlich der N-terminalen Erweiterungen durch vervielfältigte Translationsinitiationsstellen, zwei Codons (Start + Gly) für die gleichen Aminosäuren (Varshavsky, 1996). Ein Einfluss der Konstrukte auf die Proteinstabilität kann somit weitgehend ausgeschlossen werden und Änderungen der Proteinakkumulation auf Änderungen der Translationsinitiation zurückgeführt werden. Dass ein Einfluss der SD-Sequenz-Varianten auf die Translation vorliegt, konnte anhand unterschiedlicher Ribosomenbeladung des gfp-Transkripts gezeigt werden (Abb. 3.10). Eine verstärkte Beladung des gfp-Transkripts mit Ribosomen resultierte in einer vergrößerten Proteinakkumulation. Für E. coli liegen bereits *in vivo*-Daten zur Rolle von SD-Sequenzen in der Translation vor (Boni *et al.*, 2001; Fargo *et al.*, 1998). Bisher wurden jedoch keine Daten hierzu in Plastiden ermittelt. Die für Plastiden gewonnenen *in vitro*-Daten zeigten ein widersprüchliches Bild (vgl. Hirose und Sugiura, 1996; 2004a).

## 4.1.1 Einfluss der SD-Sequenz-Varianten auf die RNA-Akkumulation

Die RNA-Akkumulation schwankte sehr stark im Vergleich der synthetischen Konstrukte in beiden untersuchten Systemen (Tab. 3.1 und Tab. 3.3). SD-Sequenz-Varianten mit vervielfachten SD-Sequenzen führten in *E. coli* zu einer Abnahme der RNA-Akkumulation (Tab. 3.1), wohingegen in Plastiden gleichbleibende bzw. leicht steigende *gfp*-Transkriptmengen zu beobachten waren (Tab. 3.3). Dies ist auf einen Einfluss der veränderten 5' UTR auf die Transkriptstabilität zurückzuführen, da in allen Konstrukten der Promotor beibehalten wurde und damit die Transkriptionsrate gleich bleiben sollte (Abb. 3.1).

Die Ursachen für unterschiedlich hohe Transkriptstabilität sind nicht geklärt, hängen jedoch stark von der Art des Transkripts und der regulatorischen Sequenzen in der 5' UTR ab (Barnes *et al.*, 2005; Eibl *et al.*, 1999). Es konnte gezeigt werden, dass die Halbwertszeit von Transkripten in *E. coli* und Plastiden äußerst unterschiedlich ist. Es wurden Zeiten von Minuten (*E. coli*) und Stunden (Chloroplasten) ermittelt (Brawerman, 1987; Kim *et al.*, 1993). Somit sind grundlegende Unterschiede zwischen *E. coli* und Plastiden zu erwarten.

Sekundärstrukturen der RNA besitzen ebenfalls einen Einfluss auf die Stabilität der Transkripte (Stern *et al.*, 1984). Im Rahmen dieser Untersuchung konnte jedoch in beiden Systemen keine Abhängigkeit der RNA-Menge von der Stabilität von Sekundärstrukturen in der 5' UTR ermittelt werden. Die Form der Sekundärstrukturen wurden im Rahmen dieser Arbeit zusammen mit ihren Faltungsenthalpien *in silico* bestimmt (Zuker, 2003), wobei keine Korrelation zwischen Höhe der Faltungsenthalpie und der RNA-Akkumulation erkennbar war (Tab. 3.5). Zum Beispiel enthielt die Sekundärstruktur, die für das Konstrukt pOD 3 *in silico* ermittelt wurde, einen längeren doppelsträngigen Bereich, der Ähnlichkeiten mit einer Stamm-Schleifen-Struktur aufwies (Abb. A.3). Es konnte jedoch kein Unterschied der RNA-Akkumulation im Vergleich zum Konstrukt pOD 2 ermittelt werden, welches diese Struktur nicht aufwies (Abb.A.2).

Ein Einfluss der unterschiedlichen Inkubationstemperatur von Tabak und *E. coli* wurde im Rahmen dieser Arbeit vernachlässigt. Es gibt Hinweise in *E. coli*, dass die Inkubationstemperatur einen Einfluss auf die optimale Länge der SD-Sequenz besitzt (Vimberg *et al.*, 2007). Diese stieg mit steigender Temperatur. Für *N. tabacum*-Plastiden liegen keine Daten vor. Im Rahmen dieser Arbeit wurde jedoch eine konstante Länge der SD-Sequenzen in beiden untersuchten Organismen genutzt.

Zusätzlich zur Temperatur beeinflussen RNA-bindende Proteine und die Konzentration von Ionen wie z.B.  $Mg^{2+}$  die Sekundärstruktur der RNA, die sich in *E. coli* und Tabakplastiden unterscheiden (Herschlag, 1995). Der Einfluss dieser Faktoren ist vermutlich dem der Inkubationstemperatur überlegen.

Ein limitierender Einfluss der RNA-Menge auf die Proteinakkumulation konnte in *E. coli* nicht erkannt werden, da eine geringe RNA-Menge in Konstrukten mit hoher Proteinmenge ermittelt werden konnte (Tab. 3.1). Ein fehlender Effekt der RNA-Akkumulation auf die Proteinmenge konnte in Plastiden von Choquet und Wollman (2002) sowie Eberhard *et al.* (2002) festgestellt werden. In beiden Untersuchungen führte eine Absenkung der Transkriptmenge zu keiner Verringerung der Proteinmenge.

In Plastiden ergaben sich jedoch Hinweise auf eine erhöhte Transkriptstabilität durch hohe Translationsraten. In Konstrukten mit hoher Proteinakkumulation konnten ebenfalls hohe Transkriptmengen ermittelt werden. In E. coli beobachteten lost und Dreyfus (1995) einen ähnlichen Effekt. Inwiefern die Transkriptakkumulation durch eine starke Translation von Mini-ORFs in der 5'UTR der Konstrukte pOD 8 und 9 positiv beeinflusst wird, konnte mit Hilfe des verwendeten Nachweises nicht ermittelt werden. Die Translationsprodukte der Mini-ORFs, ein Dipeptid aus fMet und Glycin, konnten nicht detektiert werden. Da in allen Konstrukten der gleiche Promotor verwendet wurde und mit der gleichen Transkriptionsrate zu rechnen war, kann für Plastiden angenommen werden, dass eine verstärkte Translation des Transkripts dessen Stabilität erhöht. Agaisse und Lereclus (1996) ermittelten ebenfalls einen stabilisierenden Effekt von Ribosomen auf die gebundenen Transkripte. In dem untersuchten Fall banden Ribosomen an eine 5' gelegene SD-Sequenz des Transkripts, die jedoch auf Grund des großen Abstands zum Startcodon nicht an der Translationsinitiation beteiligt war. Den stabilisierenden Effekt der Bindung von Ribosomen an die 5'UTR konnten Wagner *et al.* (1994) ebenfalls zeigen, wobei jedoch nicht die Translation des gesamten Transkripts die Stabilisierung beeinflusste. Eine ineffiziente Translationsinitiation sowie die Translation des ersten Teils der kodierenden Sequenz führten zur Stabilisierung des Transkripts. Es wäre möglich, dass Ribosomen durch ihre Bindung die RNA vor nukleolytischen Prozessen schützen.

### 4.1.2 Rolle des Abstands der SD-Sequenzen zueinander auf die Translationsrate

In *E. coli* und Plastiden konnten Ähnlichkeiten in der Abhängigkeit der Translationsinitiation von der Anordnung der SD-Sequenzen erkannt werden. Dies ist aufgrund der prokaryotischen Eigenschaften beider Systeme zu vermuten. Die Rolle des Abstands der SD-Sequenzen wurde mit Hilfe der Konstrukte pOD 6 und 7 sowie pOD 2 und 3 untersucht, die vervielfachte SD-Sequenzen ohne und mit Abstand enthielten (Abb. 3.1). Hierbei zeigte sich, dass eine einfache Vervielfältigung aufeinanderfolgender SD-Sequenzen keinen positiven Effekt auf die Translationsinitiation entfaltete (Tab. 3.1 und Tab. 3.3). In Konstrukten mit drei direkt aufeinanderfolgenden SD-Sequenzen befindet sich die 5' gelegene SD-Sequenz 28 nt vom Startcodon entfernt (pOD 7 in Abb. 3.1). Die Effizienz der Translationsinitiation ist jedoch in *E. coli* sowie Plastiden abhängig vom Abstand der SD-Sequenz zum Startcodon (Ringquist *et al.*, 1992; Ruf und Kössel, 1988; Shultzaberger *et al.*, 2001). So konnten in *E. coli* von Vellanoweth und Rabinowitz (1992) sinkende Translationsraten bei steigendem Abstand SD-Sequenz–Startcodon ermittelt werden. Die Abstandsabhängigkeit in Plastiden ist stärker ausgeprägt als in *E. coli* (Tab. 3.3 und Tab. 3.1 pOD 6 und 7).

Die Einführung von Nukleotiden zwischen SD-Sequenzen führte in beiden Systemen zu einer erhöhten Effizienz der Translationsinitiation im Vergleich zu Konstrukten mit direkt aufeinanderfolgenden SD-Sequenzen (Tab. 3.3 und Tab. 3.1 pOD 2 und 3). Jedoch im Vergleich zum Referenzkonstrukt sank in Plastiden die Translationsinitiationseffizienz (Tab. 3.3), wohingegen sie in *E. coli* stieg (Tab. 3.1). Dies deutet auf unterschiedliche Bindungscharakteristika von plastidären und eubakteriellen Ribosomen hin.

Die Beobachtung, dass zusätzliche Ribosomenbindestellen die Translationsinitiationseffizienz vermindern, konnte auch von Reinbothe *et al.* (1993) gemacht werden. Sie zeigten, dass eine in einer Prozessierungsvariante des *rbcL*-Transkripts am 5' Ende gelegene SDähnliche Sequenz die Ursache für eine verminderte Translation des entsprechenden Transkripts war.

Wie schon erwähnt führte in *E. coli* jedoch die potentielle Steigerung der Ribosomenkonzentration an der 5' UTR, die durch SD-Sequenzen mit Abstand von 39 nt zueinander erreicht wurde, zu einer Verbesserung der Translationseffizienz. Aneinandergereihte SD-Sequenzen ohne Abstand erzielten hingegen keine Verbesserung der Initiationseffizienz (Tab. 3.1). Die Abnahme der GFP-Menge in beiden Systemen durch vervielfältigte SD-Sequenzen mit und ohne Abstand kann auch durch die Ergebnisse von Wen *et al.* (2008) erklärt werden, die *in vitro* eine Verlangsamung von an mRNA gebundenen Ribosomen durch zusätzliche SD-Sequenzen ermittelten. Hier unterbrachen die Ribosomen die Bewegung entlang der mRNA kurzzeitig durch die Bindung der 16 S rRNA an eine SD-Sequenz. Eine alternative Erklärung ist der schon erwähnte größere Abstand zwischen SD-Sequenz und Startcodon, der einen negativen Effekt auf die Translationsinitiation haben kann (Vellanoweth und Rabinowitz, 1992).

#### 4.1.3 Einfluss von cis-Elementen auf die Translationsinitiation

In den Konstrukten mit multiplen Translationsinitiationsstellen (pOD 11-15 und 22 sowie pOD 17-21 Abb. 3.1) waren GFP-Varianten mit N-terminalen Erweiterungen zu erwarten. Für eine biotechnologische Anwendung der untersuchten Konstrukte musste eine Möglichkeit untersucht werden, die N-terminalen Erweiterungen posttranslational zu entfernen. Aus diesem Grund wurde eine Nukleotidsequenz 5' des *gfp* eingefügt, die eine Proteaseerkennungsstelle kodiert. Die Wahl der Protease fiel auf das gut untersuchte Enzym Tabak-Ätzvirus-Protease ("tobacco etch virus" TEV) (van den Berg *et al.*, 2006; Shih *et al.*, 2005). Dieses Enzym zeichnet sich durch eine hohe Spezifität in der Erkennungssequenz aus (Tözsér *et al.*, 2005). Weitere Proteasen wie der Koagulationsfaktor X zeigen eine im Vergleich geringere Spezifität (Kapust *et al.*, 2002; Ludeman *et al.*, 2003). In E. coli und Tabakplastiden erzielten alle Konstrukte mit TEV-Peptid (pOD 11-15/22 Abb. 3.1) eine niedrigere Translationseffizienz im Vergleich zu Konstrukten ohne diese Erkennungssequenz (pOD 17-21 Abb. 3.1) am N-Terminus des GFP (Tab. 3.1 und Tab. 3.3). Als Ursache für diesen Effekt ist ein Einfluss von Sekundärstrukturen denkbar (Nakamoto, 2006). Sekundärstrukturen können durch Abdeckung der SD-Sequenz zu einer verminderten Translationsrate führen (de Smit et al., 2008; Neupert et al., 2008). Diese Strukturen sind jedoch in Konstrukten mit TEV-Erkennungssequenz nicht stärker ausgebildet (z.B. Abb. A.12 im Vergleich zu Abb. A.1). Berechnungen der freien Faltungsenthalpien (Mathews et al., 1999; Zuker, 2003) ergaben für Konstrukte mit TEV-Sequenz verminderte freie Enthalpien, welche aus der Betrachtung einer längerer mRNA-Sequenzen (5' UTR +TEV-Signal) im Vergleich zu Konstrukten ohne diese Sequenz (5'UTR keine TEV vorhanden) resultierten (vgl. pOD 11-15/22 und pOD 17-21 in Tab. 3.5). Eine Abhängigkeit der Translationseffizienz von der Faltungsenthalpie ließ sich nicht erkennen (pOD 11-22 in Tab. 3.1, Tab. 3.3 und Tab. 3.5). Ebenso konnten keine nachteiligen Sekundärstrukturen ermittelt werden, die zu einer Blockade der SD-Sequenzen führten (Abb. A.10-A.19). In E. coli konnte gezeigt werden, dass stabile Sekundärstrukturen einen positiven Einfluss auf die Translationsrate von mRNA haben konnten (Newbury et al., 1987; Stern et al., 1984). Diese beinhalteten jedoch nicht die SD-Sequenz.

Weitere cis-Elemente, die einen Einfluss auf die Translationsinitiation besitzen sind AUreiche Sequenzabschnitte und damit schwach strukturierte Bereiche der 5'UTR (Skorski et al., 2006; Vimberg et al., 2007). Die Sequenz der Konstrukte beinhaltet jedoch 5' jeder SD-Sequenz vergleichbare Sequenzen, wodurch ein Einfluss dieser ausgeschlossen werden kann. Gleiches gilt ebenso für die Nukleotidsequenz zwischen SD-Sequenz und Startcodon (Rinke-Appel et al., 1994). Hier wurde in allen Konstrukten eine Nukleotidabfolge mit identischen Eigenschaften eingefügt, weshalb auch an dieser Stelle kein Effekt der Konstrukte mit TEV-Sequenz zu erwarten ist. Von Sprengart et al. (1996) wurde die Wirkung von Sequenzen 3' des Startcodons untersucht, ein Einfluss auf die Translationsinitiation ermittelt und als "Downstream-Box" bezeichnet. Ein Einfluss der Sequenzen in der kodierenden Region konnte nicht abschließend geklärt werden, da weitere Untersuchungen diesen Einfluss nicht belegen konnten (Moll et al., 2001; O'Connor et al., 1999). Einen Hinweis auf eine verstärkte Translationsrate in Konstrukten mit A/U-reichen Sequenzen 3' des Startcodons lieferten Qing et al. (2003). Die verringerte Tendenz zur Ausbildung von Sekundärstrukturen wurde als eine mögliche Ursache angeführt, da keine Sequenzabhängigkeit sondern eine Bevorzugung eines hohen A/U-Gehalts ermittelt werden konnte. Konstrukte, mit und ohne TEV-Erkennungssequenz, besitzen im entsprechenden Sequenzabschnitt eine unterschiedliche Nukleotidabfolge. Da in beiden Konstruktklassen in diesem Bereich keine Homologie zur 16 S rRNA erkannt werden konnte, kann ein Effekt durch eine Bindung dieser Sequenzen an die 16 S rRNA, in Form der postulierten "Downstream-Box", für die Konstrukte mit und ohne TEV-Signal ausgeschlossen werden. Der A/U-Gehalt ist in beiden Konstruktklassen in diesem Bereich mit 74% (mit TEV) und 63% (ohne TEV)

ähnlich hoch.

Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass die für die TEV-Erkennungsstelle kodierende mRNA-Sequenz zu einer für die Translation nachteiligen Struktur führt und damit für die geringere Translationseffizienz verantwortlich war. Inwiefern diese Struktur die Translation oder deren Initiation beeinflusst konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht bestimmt werden.

### 4.1.4 Einfluss von kleinen ORFs auf die Translationsinitiation

Ergänzend zu den Konstruktserien mit multiplen SD-Sequenzen (pOD 2, 3, 6 und 7 in Abb. 3.1) wurden SD-Sequenz-Varianten mit zusätzlichen kurzen offenen Leserastern generiert (pOD 4, 5, 8 und 9 in Abb. 3.1). Diese Konstrukte enthielten ein bzw. zwei Leseraster in der 5'UTR des Reportergentranskripts, wobei diese Leseraster bei der Konstruktserie pOD 4 und 5 aus einem Start- und Stopcodon bestanden und bei pOD 8 und 9 zusätzlich ein Glycincodon enthielten. In diesen Konstrukten konnte somit der Einfluss eines Elongationsschritts auf die Reinitiation untersucht werden, die in *E. coli* durch SD-Sequenzen 5' des nachfolgenden ORFs gefördert wird (Yoo und RajBhandary, 2008). Die Reinitiation innerhalb der 5'UTR zur Bildung des GFP hatte in beiden untersuchten Systemen eine geringere Proteinakkumulation des Reporters im Vergleich zum Referenz-konstrukt zur Folge (Tab. 3.1, Tab. 3.3).

Die SD-Sequenz-Varianten mit Leserastern in der 5' UTR stellten vereinfachte Operonstrukturen nach. Von Spanjaard und van Duin (1989) konnte ermittelt werden, dass in *E. coli* die Translation 3' gelegener Leseraster in Abhängigkeit der Translation der 5' gelegenen ORFs stattfindet. SD-Sequenzen förderten die Reinitiation. Während im Rahmen dieser Arbeit in *E. coli* kein Unterschied in der Translationsinitiationseffizienz für die Konstrukte pOD 4 und 5 verglichen mit pOD 8 und 9 erkannt werden konnte (Tab. 3.1), zeigte sich in Plastiden ein anderes Bild. In Plastiden fiel die Translationsinitiation in den Konstrukten pOD 8 und 9 im Vergleich zu den Konstrukten pOD 4 und 5 stark ab (Tab. 3.3). Der Übergang der Ribosomen vom Initiations- in den Elongationskomplex (Marshall *et al.*, 2008; Julián *et al.*, 2008) resultierte in einer verringerten Fähigkeit an 3' gelegenen SD-Sequenzen erneut eine Translation zu initiieren (Tab. 3.3). Es ist möglich hier Parallelen zu eukaryotischen Systemen zu ziehen. Kozak (2005) beschreibt Beobachtungen in Eukaryoten, dass in der 5' UTR gelegene uORFs (upstream ORFs) die Translationseffizienz des 3' gelegenen ORFs massiv beeinträchtigen konnten.

Während in *E. coli* die Reinitiation somit erfolgreich verläuft, ist Plastiden nach erfolgter Elongationsreaktion der Ribosomen ähnlich zu Eukaryoten keine oder nur eine abgeschwächte Reinitiation zu beobachten.

## 4.1.5 Nutzung aufeinanderfolgender Translationsinitiationsstellen in *E. coli* und Plastiden

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Konstrukte untersucht, die multiple Translationsinitiationsstellen (SD-Sequenz zuzüglich Startcodon) beherbergten. In *E. coli* zeigte sich für diese Konstrukte eine nahezu gleichverteilte Nutzung aller Translationsinitiationsstellen in der 5' UTR. So konnten für alle SD-Sequenzen GFP-Varianten mit entsprechenden Nterminalen Erweiterungen nachgewiesen werden (Tab. 3.2 und Abb. 3.7). Dieses Verhalten kann mit Hilfe der Ergebnisse von Spanjaard und van Duin (1989) erwartet werden, da es sich bei diesen Konstrukten ähnlich zu pOD 4 und 5 sowie pOD 8 und 9 (Abb. 3.1) um operonähnliche Strukturen handelt.

In Tabakplastiden hingegen konnte gezeigt werden, dass in den Konstrukten mit multiplen Initiationsstellen die Nutzung dieser von 5' nach 3' abnimmt. So zeigten die Konstrukte pOD 11, 14 und 15 eine fehlende Akkumulation der GFP-Variante, die aus der Nutzung der 3' gelegenen SD-Sequenz hervor gehen (Tab. 3.4). In Plastiden kann folglich eine Tendenz erkannt werden, 5' gelegene Translationsinitiationsstellen zu bevorzugen.

In Mais konnten ähnliche Ergebnisse ermittelt werden. Hier führte die Mutation eines nukleären Gens zu mangelhafter Prozessierung des petB/petD-Dicistrons, was zu deutlich schlechteren Translationseffizienz des 3' gelegenen petD-Transkripts führte (Barkan, 1988; Barkan *et al.*, 1994; Westhoff und Herrmann, 1988). Einen ähnlichen Effekt erkannten Hirose und Sugiura (1997) bei der Untersuchung des Dicistrons aus psaC und ndhD. Hierbei war *in vitro* keine Translation des ndhD-Cistrons im ungespaltenen Transkript möglich.

## 4.1.6 Mechanismus der Selektion von SD-Sequenzen in *E. coli* und Plastiden

Die Bindung von Ribosomen an die 5' UTR von Transkripten erfolgt wahrscheinlich bevorzugt über unstrukturierte AU-haltige Bereiche. Hierfür gibt es Hinweise in *E. coli* und Plastiden. So konnte von Vimberg *et al.* (2007) für *E. coli* eine verstärkte Translation nachgewiesen werden, wurden AU-reiche Sequenzen in die 5' UTR eingefügt. Der A/U-Gehalt der entsprechenden Sequenz war in den bearbeiteten Konstrukten im Vergleich zueinander identisch (69 %) und dem der in Vimberg *et al.* (2007) erwähnten translationsfördernden Sequenz ähnlich (74 %). Studer und Joseph (2006) zeigten, dass einzelsträngige Bereiche in Stamm-Schleifen-Strukturen die Bindung der 30 S Untereinheit von *E. coli*-Ribosomen fördern. de Smit und van Duin (2003) stellten zusätzlich die Rolle unstrukturierter Bereiche in der 5' UTR heraus. 30 S ribosomale Untereinheiten binden diese Sequenzen, gefördert durch das S1-Protein des Ribosoms (Komarova *et al.*, 2002), und bewirken anschließend eine Entfaltung von Sekundärstrukturen der mRNA. Hinweise auf ähnliche Bindungsmechanismen plastidärer Ribosomen lassen sich durch die Beschreibung der Bindungseigenschaften des plastidären S1-Proteins von Franzetti *et al.* (1992) und Merendino *et al.* (2003) ableiten. Dieses Protein ist auch in Plastiden mit Ribosomen assoziiert.

5' der in dieser Arbeit untersuchten SD-Sequenzen waren AU-reiche Sequenzen vorhanden, konnten jedoch nicht die Unterschiede in der Effizienz der Translationsinitiation erklären, da in allen Konstrukten nahezu identische Sequenzen genutzt wurden (Tab. 2.3).

Ebenso ist eine Rolle der letzten Base der 5'UTR bzw. die -1 zum Startcodon gelegene Base ermittelt worden (Esposito *et al.*, 2001). Sie ermittelten, dass ein U an Position -1 in Bezug auf das Startcodon einen positiven Effekt auf die Translationsinitiation hatte. In einigen, der in dieser Arbeit untersuchten Konstrukte, war dieses Nukleotid an dieser Position vorhanden (pOD 4, 5, 8-22 in (Tab. 2.3)). Ein Effekt dieses Nukleotids konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht beobachtet werden (Tab. 3.1, Tab. 3.3).

Die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Daten ergaben für *E. coli* und Plastiden Unterschiede in der Abhängigkeit der Translationsinitiation von SD-Sequenzen. In Plastiden konnte in Konstrukten mit multiplen SD-Sequenzen eine Abschwächung der Translation erkannt werden. Dieser Effekt konnte in Konstrukten mit multiplen Translationsstartpunkten näher untersucht werden. Es stellte sich heraus, dass die 5' Initiationsstelle in nahezu allen Konstrukten intensiver genutzt wurde als die nachfolgenden Initiationspunkte (Tab. 3.4).

Diese Bevorzugung 5' gelegener SD-Sequenzen kann aus einer  $5' \rightarrow 3'$ -Bewegung des Ribosoms folgen, die auf eine Bindung der 30 S ribosomalen Untereinheit an die 5' UTR strangaufwärts der SD-Sequenzen folgt. Hier wäre die Bindung der Untereinheit an die genannten AU-reichen Sequenzen denkbar (Franzetti *et al.*, 1992; Merendino *et al.*, 2003). Einen Hinweis auf einen geringen Beitrag dieser Sequenzen liefern Konstrukte mit in Abstand liegenden SD-Sequenzen (mit inserierten AU-reichen Sequenzen, z.B. pOD 14, 15, Tab. 3.4). Hier wäre zu erwarten, dass auch 3' gelegene SD-Sequenzen stärker genutzt werden als in dicht aufeinanderfolgenden SD-Sequenzen ohne zwischenliegende AU-reiche Sequenzen (pOD 14 und 15 gegenüber pOD 11 und 12), was nicht der Fall war (Tab. 3.2, Tab. 3.4). Zusätzlich ist mit Hilfe der Konstrukte pOD 8 und 9 im Vergleich zu pOD 4 und 5 (Abb. 3.1) zu erkennen, dass beim Übergang vom Initiations- in den Elongationskomplex (Marshall *et al.*, 2008; Julián *et al.*, 2008) die Effizienz der 5' $\rightarrow$ 3'-Bewegung abnimmt und damit die Nutzung der 3' liegenden SD-Sequenzen bzw. Translationsinitiationsstellen zurück geht.

Eine weitere Möglichkeit ist die Bindung der 30 S-Untereinheit an Regionen in der Nähe oder am 5'Ende der mRNA. Eine "capping"-Struktur der mRNA, wie sie in Eukaryoten zu finden ist (Kozak, 1999), ist in plastidären Transkripten nicht vorhanden (Peled-Zehavi und Danon, 2007). Daher ist eine Bindung des plastidären Ribosoms an diese Struktur nicht möglich. Eine potentielle Bindungsstelle am 5'Ende der mRNA stellt der 5'Phosphatrest prozessierter bzw. Triphosphatrest unprozessierter Transkripte dar. Es konnte gezeigt werden, dass plastidäre Ribosomen Polyphosphat binden und in Abwesenheit von Polyphosphat eine erhöhte Fehlerrate der Translation aufweisen (McInerney *et al.*, 2006). Es ist daher denkbar, dass Ribosomen mit Phosphatresten am 5' Ende der mRNA interagieren, um einen vorläufigen Kontakt zwischen Ribosom und Transkript herzustellen. Die direkte Bindung von Ribosomen an den 5' Phosphatrest einer mRNA wurde jedoch bisher nicht gezeigt.

Die in dieser Arbeit ermittelte  $5' \rightarrow 3'$ Bevorzugung der Translationsinitiationsstellen legt nahe, dass SD-Sequenzen in der primären Bindung des Transkripts an die 30 S Untereinheit eine untergeordnete Rolle zukommt. Sollten SD-Sequenzen in die primäre Bindung eingreifen, sollte deren Position in der 5'UTR keine Bedeutung haben.

Hinweise auf die Bindung 5' gelegener Regionen und anschließender Bewegung Richtung Startcodon lieferten Ergebnisse aus der Untersuchung der Translation von di- bzw. polycistronischen Transkripten in Plastiden. Diese werden in Wildtyp-Pflanzen meist gespalten, jedoch konnten Mutanten isoliert werden, die in diesem Prozess für einige Transkripte Defizite aufweisen. Ein massiver Effekt auf die Translation des 3' gelegenen ORF konnte darauf folgend beobachtet werden.

Barkan et al. (1994) zeigten zum Beispiel, dass die Translation des 3' gelegenen petD-Transkripts des petB/petD-Dicistrons weniger effektiv erfolgt, sollte durch einen Gendefekt die Prozessierung des Dicistrons zu monocistronischen Transkripten ausbleiben. Hierbei handelte es sich um die crp1-Mutante in Mais, bei der ein kernkodierter RNA-Prozessierungsfaktor durch Mutation zerstört wurde. Weitere Hinweise auf die wichtige Rolle der Spaltung polycistronischer Transkripte liefert die hcf107-Mutante. Die unvollständige Prozessierung des Transkripts des *psbB*-Operons führte zur Einstellung der Translation des psbH-Cistrons, das im polycistronischen Transkript 3' des psbB liegt (Felder *et al.*, 2001). Die *crr2*-Mutante zeigt ähnliche Symptome. So kommt es in dieser Mutante zu einer fehlenden Spaltung des rps7/ndhB-Dicistrons und damit auch verringerter Translation des 3' liegenden Cistrons (ndhB) (Hashimoto et al., 2003). In diesen Beispielen zeigt sich die wichtige Rolle der Prozessierung polycistronischer Transkripte in Zusammenhang mit der Evolution der ursprünglich prokaryotischen Translationsinitiationsmechanismen hin zu den plastidären. Prokaryotische Operons werden zu polycistronischen Transkripten abgelesen und zuverlässig translatiert (Kozak, 2005). Auf der anderen Seite entwickelte sich in Plastiden parallel zur Translation 3' gelegener Cistrons mit verringerter Effizienz die Prozessierung polycistronischer Transkripte zu monocistronischen. Die Prozessierung polycistronischer Transkripte ist jedoch nicht obligatorisch für alle Transkripte, die in Plastiden aus Operons hergestellt werden. Als Beispiel für eine effektive Translation dicistronischer Transkripte kann das psaA/psaB-Transkript angeführt werden (Meng et al., 1988). Einen Hinweis auf noch ungeklärte Aspekte der Translation polycistronischer Transkripte lieferten die Beobachtungen von Barkan (1988) in Zusammenhang mit Barkan et al. (1994). Es konnte ermittelt werden, dass das pentacistronische Transkript psbB-psbT-psbH-petB-petD in allen Prozessierungsstufen mit Ribosomen assoziiert ist (Barkan, 1988), jedoch ist nachgewiesen worden, dass die Translation des psbHund des *petB*-Transkripts beeinträchtigt ist (Felder *et al.*, 2001; Barkan *et al.*, 1994), wenn

es zu einer unvollständigen Prozessierung des pentacistronischen Transkripts kommt. Bisher ist nicht bekannt welche Untereinheiten des plastidären Ribosoms die hier beschriebene 5' $\rightarrow$ 3' Bewegung auf der mRNA vermitteln könnten. Es ist jedoch denkbar, dass plastidenspezifische Untereinheiten bzw. weitere nukleär kodierte Proteine diese Eigenschaft vermitteln (Yamaguchi *et al.*, 2000; Yamaguchi und Subramanian, 2003). Im Vergleich *E. coli*- zu Plastidenribosom fiel auf, dass nichtkonservierte Untereinheiten hauptsächlich in der 30 S-Untereinheit des plastidären Ribosoms zu finden waren (Manuell *et al.*, 2004; Yamaguchi *et al.*, 2002). Eine Rolle dieser in zusätzlichen bzw. veränderten Initiationsmechanismen ist denkbar, besonders vor dem Hintergrund bekannter RNA-bindenden Proteindomänen in ribosomalen Proteinen. Hierzu zählt eine S1-Domäne in einem plastidenspezifischen ribosomalen Protein (PSRP7). Dem S1-Protein kommt in der mRNA-Bindung des Ribosoms eine wichtige Rolle zu (Yamaguchi *et al.*, 2002; Franzetti *et al.*, 1992).

Eine auf polycistronische Transkripte hin optimierte Translationsinitiation konnte in *E. coli* gezeigt werden (Spanjaard und van Duin, 1989). Hier ist die Translation des 3' gelegenen Cistrons positiv von der Translation des 5' gelegenen Cistrons beeinflusst. Dies erklärt den geringeren Abfall der Nutzung 3' gelegener Translationsinitiationsstellen.

Den SD-Sequenzen in den untersuchten Konstrukten kommt wahrscheinlich nicht die Rolle der primären Bindung der mRNA an die 30 S-Untereinheit der Ribosomen zu. Sie dienten jedoch zur korrekten Positionierung des Ribosoms am Startcodon, sodass die Translation des Reportergens gfp initiiert wurde. Hierzu wurden ähnliche Daten in Plastiden sowie E. coli ermittelt. So konnten Hirose und Sugiura (2004b) für das atpB-Transkript, das keine SD-Sequenz enthält, zeigen, dass AU-reiche Sequenzen die Bindung des Transkripts an die 30 S ribosomale Untereinheit ermöglichen. Fügten sie eine Translationsinitiationsstelle (SD-Sequenz und Startcodon) ein, führte dies zur Translationsinitiation an der neu eingefügten Initiationsstelle, wobei es zu keiner messbaren Translation der nativen Initiationsstelle kam.

Die Rolle der SD-Sequenz gegenüber AU-reichen Sequenzen wurde von Park *et al.* (2007) herausgestellt. Sie ermittelten einen wesentlich stärkeren Effekt von Mutationen in der SD-Sequenz im Vergleich zur 5' gelegenen Sequenz der 5' UTR.

#### 4.1.7 Anwendungsmöglichkeiten der gewonnenen Ergebnisse

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Konstrukte resultierten in unterschiedlicher Akkumulation des Reporterproteins GFP in *E. coli* sowie Plastiden. In *E. coli* konnte die höchste Proteinakkumulation für die Konstrukte pOD 15 und 22 gemessen werden (Tab. 3.1), die niedrigste für pOD 4 und 8. In Plastiden erzielten die Konstrukte pOD 12 und 18 die höchste Translationsinitiationseffizienz und die niedrigste pOD 8 und 13 (Tab. 3.3). Als biotechnologische Produktionsplattform besitzen beide Systeme Vorzüge. *E. coli* bietet hohe Transformationsraten und schnelles Wachstum. Plastiden hingegen die Möglichkeit preiswerte Produktion auf großen Flächen durchzuführen (Hager und Bock, 2000; Bock und Khan, 2004). Zusätzlich bieten transplastomische Pflanzen in den meisten Pflanzen durch maternale Vererbung der Plastiden Schutz gegen unkontrollierte Verbreitung der Transgene mit den Pollen (Bock, 2007; Ruf *et al.*, 2007). Die hocheffizienten Konstrukte sind für eine Anwendung für die Produktion großer Mengen rekombinanter Proteine nutzbar, wie z.B. von Antigenen oder Antikörpern (Zhou *et al.*, 2008). Konstrukte, die eine geringe Translationsinitiationseffizienz vermitteln, können Anwendung in der Funktionsaufklärung von essentiellen plastidären Proteinen finden, bei denen eine Deletion zu keinen lebensfähigen Zellen führt (Rogalski *et al.*, 2006), jedoch eine Reduktion der Proteinmenge einen Phänotyp hervor ruft.

# 4.1.8 Zukünftige Experimente zur detaillierten Untersuchung der Rolle von SD-Sequenzen in Plastiden

In Plastiden konnte gezeigt werden, dass 5' gelegene Translationsinitiationsstellen bevorzugt genutzt werden. Weitere Experimente zur Untersuchung der Translationsinitiation in Plastiden bieten sich für die Konstrukte an, die eingebette ORFs in der 5' UTR enthalten. Kim und Mullet (1994) ermittelten durch den Abbruch der cDNA-Synthese an der Bindungsstelle der an die mRNA gebundene Ribosomen den exakten Bindungsort der Ribosomen an die 5' UTR. Dieser experimentelle Ansatz bietet sich für die Konstrukte pOD 2 bis pOD 9 an. Besonders geeignet sind jedoch die Konstrukte pOD 4 und 5 sowie pOD 8 und 9 mit kleinen ORFs innerhalb der 5' UTR, da Ribosomen in diesen Konstrukten vollständige Translationsinitiationsstellen vorfinden. Zusätzlich besteht die Möglichkeit aufzuklären an welche Strukturen der RNA die plastidären Ribosomen binden.

Welche Faktoren die 5' $\rightarrow$ 3'-Bewegung des Ribosoms in Plastiden vermitteln, ist nicht bekannt. Hier könnte eine Population aus Deletions- bzw. Insertionsmutanten, die im Plastidengenom ein entsprechendes Testkonstrukt enthalten, weitere Erkenntnisse liefern. Als Organismus bietet sich *C. reinhardtii* an. *Arabidopsis thaliana* ist aufgrund fehlender Transformationsprotokolle für die Plastiden nicht zur Untersuchung des Mechanismus geeignet. Auf der anderen Seite können Ansätze, die die Aufklärung des RNA-bindenden Proteoms zum Ziel haben, weitere Erkenntnisse bieten. Mit Hilfe der durch diese Ansätze gewonnen Daten, kann eine gezielte Suche nach Faktoren erfolgen, die die Ribosomenbewegung vermitteln.

Inwiefern Sekundärstrukturen innerhalb des Prozesses der 5' $\rightarrow$ 3'-Bewegung eine Rolle spielen kann durch weitere Konstrukte mit stabilen oder instabilen Strukturen innerhalb der 5' UTR bzw. eingebettet zwischen kleine ORFs in der 5' UTR aufgeklärt werden. In Anlehnung an Neupert *et al.* (2008) böten letztgenannte Konstrukte die Möglichkeit von Untersuchungen bei verschiedenen Temperaturen, um den Einfluss der Sekundärstrukturen näher zu beleuchten.

94

# 4.2 Untersuchungen zur Bastardbleichheit in der Gattung *Pelargonium*

In der Gattung *Pelargonium* konnte Bastardbleichheit in Hybriden aus *P. roseum* und *P. zonale* cv. Stadt Bern sowie *P. zonale* cv. Trautlieb beobachtet werden (Metzlaff, 1980). Aufgrund biparentaler Vererbung enthalten die Hybride meist die Plastiden beider Elternpflanzen, wobei durch somatische Segregation Entmischungen hin zu einem Plastidentypen auftreten können. Es konnte beobachtet werden, dass nur die Plastiden der Kultivare *P. zonale* cv. Stadt Bern sowie Trautlieb ausbleichen, wohingegen die Plastiden aus *P. roseum* vor dem gleichen heterozygoten Hintergrund ihre Ergrünungsfähigkeit beibehalten. Bei der Bastardbleichheit handelt sich folglich um einen plastidenspezifischen dominant-negativen Effekt einer Plastom-Genom-Inkompatibilität.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Plastom-Genom-Inkompatibilität in der Gattung *Pelargonium* mit Hilfe der Sequenzierung von drei Plastidengenomen der genannten Arten bzw. Kultivare untersucht. Hierzu zählten die Typen der Plastidengenome R, I und II (Metzlaff *et al.*, 1981). Die Plastidengenome I und II kombiniert durch Hybridisierung zeigten keine Bastardbleichheit (Metzlaff *et al.*, 1981). In den Kombinationen I-R und II-R konnte jedoch Plastom-Genom-Inkompatibilität ermittelt werden. Aus diesem Grund wurde den Unterschieden der Plastidengenome der Plastidengenome I und II zum Typ R die größte Aufmerksamkeit gewidmet.

Obwohl eine Hybridisierung unterschiedlicher Arten der Gattung *Pelargonium* möglich ist, zeigen die Hybride eine deutliche Einschränkung ihrer Fitness bezogen auf ihre Photosyntheseleistung. Dies führt zu Selektionsnachteilen und folglich zur Aufrechterhaltung bzw. Entstehung von Speziesgrenzen (Bräutigam *et al.*, 2007). Bisher ist die molekulare Grundlage in Form von "Artbildungsgenen" nur in wenigen Fällen von Genominkompatibilität in anderen Gattungen bekannt (Jiang *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2006).

## 4.2.1 Gemeinsame Eigenschaften der drei untersuchten Plastidengenome

Die drei sequenzierten Plastidengenome zeigten weitgehend eine identische Struktur im Vergleich zum Plastidengenom von P. zonale cv. Ringo white, dessen Sequenz im Zeitraum der Bearbeitung dieses Projekts publiziert wurde (Chumley et al., 2006). Alle Pelargonium-Plastidengenome zeigten eine deutliche Vergrößerung im Vergleich zum Tabakplastidengenom (Shinozaki et al., 1986) durch eine Ausweitung der invertierten Duplikationen. In keinem der Genome konnte eine vollständige kodierende Sequenz für die größte Untereinheit der plastidenkodierten RNA-Polymerase (rpoA) ermittelt werden. Es wurden nur Fragmente dieses Gens innerhalb konservierter ORFs aufgefunden (Tab. 3.9). Die im Pelargonium-Plastidengenom enthaltenen Fragmente weisen nur geringe Konservierungsgrade von 36 % im Vergleich zum RpoA-Polypeptid in N. tabacum-Plastiden auf (Kap. 3.7.3), was darauf schließen lässt, dass in *Pelargonium* ein Transfer des *rpoA*-Gens in den Kern erfolgte. Bisher konnte ein Gentransfer des plastidären *rpoA*-Gens in den Kern nur für *Physcomitrella patens* und weitere Moose gezeigt werden (Sugiura *et al.*, 2003).

Weitere Gene, die in keinem der untersuchten sowie dem bereits publizierten Genom (Chumley *et al.*, 2006) ermittelt werden konnten, waren die Gene trnT-GGU und accD. Von letztgenanntem Gen ist bekannt, dass es als Untereinheit der Acetyl-CoA-Carboxylase essentiell für die Lipidbiosynthese und damit für die Pflanzenzelle ist (Kode *et al.*, 2005). Homoplasmatisch transgene Zellen mit zerstörtem accD-Gen stellten die Zellteilung ein und führten so zu fehlenden Teilen der Blattspreite.

Da in *Pelargonium* keine kodierende Sequenz für *accD* im Plastidengenom ermittelt werden konnte (Tab. 3.9, Chumley *et al.*, 2006), muss davon ausgegangen werden, dass diese im Kerngenom lokalisiert ist. Diese Umlagerung wurde ebenfalls in den *Poaceae* ermittelt (Sasaki *et al.*, 1995). Ebenso gibt es Hinweise auf einen Transfer in *Brassica napus*, da hier die plastidäre Translation und damit die potentielle Produktion der AccD-Untereinheit nicht essentiell ist (Zubko und Day, 1998). Jedoch ist die Nukleotidsequenz des Plastidengenoms nicht bekannt, weshalb hierzu keine endgültige Antwort gegeben werden kann.

Die Deletion eines tRNA-Gens kann dramatische Auswirkungen auf die Proteinbiosynthese in Plastiden haben, auch wenn eine isoakzeptierende Form des deletierten tRNA-Gens durch "Superwobbling" die Dekodierung der entsprechenden Codons übernehmen kann (Rogalski *et al.*, 2008). So konnte nach Deletion von trnG-GCC im Plastidengenom von *N. tabacum* eine starke Reduktion der Wachstumsrate beobachtet werden. Die verbleibende trnG-UCC führte zu einer partiellen Kompensation des Effekts der fehlenden tRNA. Hierbei spielte die Base Uracil an erster Position des Anticodons eine kritische Rolle, da sie durch "Superwobbling" mit allen anderen Basen Wasserstoffbrückenbindungen eingehen kann und eine so erfolgreiche Dekodierung aller Glycincodons (GGN) ermöglicht. Im umgekehrten Fall – der Deletion des Gens trnG-UCC – kann die verbleibende tRNA-GCC die Kompensation nicht durchführen, da die Base Guanosin an erster Stelle des Anticodons nicht in der Lage ist mit allen Basen Wasserstoffbrückenbindungen einzugehen und aus diesem Grund einige Glycincodons (GGG, GGA) nicht mehr dekodiert werden können.

Die Abwesenheit der trnT-GGU in Pelargonium drückt sich jedoch weder in vermindertem Wachstum noch in einer Unterrepräsentation des Codons ACC sowie ACT aus, was als Anpassung an die fehlende tRNA zu vermuten wäre (Kap. 3.7.3, Tab. A.2, Chumley et al., 2006). In N. tabacum sowie Pelargonium konnten nahezu identische Werte für die Codonhäufigkeit dieser Codons ermittelt werden. Offensichtlich kommt es zu einer effektiven Kompensation der fehlenden tRNA-GGU durch die vorhandene tRNA-UGU. Diese Kompensation kann wie am Beispiel der tRNA-Glycin durch "Superwobbling" des Uracils an der ersten Base des Anticodons bzw. der dritten Stelle des Codons erklärt werden. Im Gegensatz zur eingeschränkten Translationseffizienz, wenn "Superwobbling" der GlytRNA erfordert wird (Rogalski et al., 2008), ist die Thr-tRNA(UGU) in beiden Organismen in der Lage, die Gesamtheit der Thr-Codons zu dekodieren. Es ist durch die Deletion des trnT-GGU nur ein hellgrüner Phänotyp in N. tabacum zu beobachten, was auf eine leicht verringerte Translationskapazität schließen lässt (Rogalski, 2008). Dass in Pelargonium dieser Effekt nicht auftritt, ist durch Anpassungsmechanismen des Translationsapparates oder der Expression von Genen deren Produkte an der Translation beteiligt sind zu erklären. So könnte die Menge an akkumulierter tRNA-UGU gesteigert werden, um den Verlust der tRNA-GGU auszugleichen. Auf der anderen Seite können Veränderungen in der 16S rRNA die Dekodierung toleranter auf "Superwobbling" machen. Hier wird im Normalfall nicht die Basenpaarung an sich überprüft wird, sondern nur ob eine Watson-Crick-Basenpaarung vorliegt (Yoshizawa et al., 1999).

#### 4.2.2 Unterschiede der Plastidengenome

Vor dem Hintergrund eines heterozygoten Kerngenoms (R/I, R/II) kommt es für die Plastidentypen I und II zur Plastom-Genom-Inkompatibilität, die sich in Form der Bastardbleichheit zeigt. Im Gegensatz dazu kann für den Plastidentyp R keine Plastom-Genom-Inkompatibilität im Zusammenhang mit den untersuchten Kerngenomen beobachtet werden. In Sequenzunterschieden der Plastidengenome sollte folglich die Ursache für die Bastardbleichheit zu finden sein.

Im Vergleich der untersuchten Plastidengenome konnte eine Vielzahl von Sequenzunterschieden ermittelt werden, die vornehmlich in den nicht-kodierenden Bereichen des Plastidengenoms lagen. Ähnliche Ergebnisse wurden auch in anderen Plastidgenomvergleichen gewonnen (Kahlau *et al.*, 2006; Schmitz-Linneweber *et al.*, 2002). Die ermittelten Sequenzunterschiede bestanden sowohl aus Einzelnukleotidaustauschen als auch aus Insertionen und Deletionen. Die Unterschiede zwischen den Plastidengenomen von *P. zonale* cv. Stadt Bern und *P. zonale* cv. Trautlieb waren deutlich schwächer ausgeprägt als die Unterschiede dieser beiden Genome zum Plastom von *P. roseum*, was die Ergebnisse aus den Restriktionsuntersuchungen von Metzlaff (1983) bestätigt. Die mit Hilfe des Martinez/Needlemann-Wunsch-Algorithmus (Burland, 2000) ermittelten Werte zur Sequenzähnlichkeit (Kap. 3.7.3) wiesen im Vergleich zur Sequenzähnlichkeit von *Solanum lycopersicum* und *S. tuberosum* geringere Konservierung auf, was jedoch im Rahmen eines phylogenetischen Stammbaums relativiert wurde. Hier zeigten die untersuchten Plastidengenome eine große Nähe zueinander (Abb. 4.1, Kap. 3.7.3).

*Oenothera* stellt eine Gattung dar, für die wie für *Pelargonium* verschiedene Plastomtypen bekannt sind. In dieser Gattung wurden fünf Plastomtypen bestimmt (Stubbe, 1959), deren Nukleotidsequenzen aufgeklärt wurden (Greiner *et al.*, 2008b). Die Plastidengenome zeigten Übereinstimmungen von 96,3 % bis 98,6 % (Greiner *et al.*, 2008b). Im Vergleich hierzu weisen die Plastidengenome der Typen R, I und II Übereinstimmungen von ca. 98 % (R gegenüber I und II) bzw. nahezu 100 % (I gegenüber II) auf. Innerhalb der Gattungen Oenothera und Pelargonium kann folglich eine ähnlich hohe Varianz zwischen den Plastidengenomen wie zwischen Plastidengenomen der Solanaceae ermittelt werden. Auf der Ebene der Sequenzähnlichkeiten unterscheidet sich die Gattung Pelargonium folglich nicht von anderen Pflanzengattungen. Jedoch konnten für einige Gene in Pelargonium und anderen Geraniaceae erhöhte Nukleotidaustauschraten ermittelt werden (Guisinger et al., 2008).



Abbildung 4.1: Phylogenetischer Stammbaum der untersuchten *Pelargonium*-Plastidengenome. Als Vergleichsgenom wurde das Plastidengenom von *N. tabacum* genutzt. *P. zonale* cv. Trautlieb und *P. zonale* cv. Stadt Bern bilden zusammen mit *Pelargonium zonale* cv. Ringo White (Chumley *et al.*, 2006) eine Gruppe, geringfügig getrennt von dieser Gruppe befindet sich *P. roseum* im Stammbaum. Der Stammbaum wurde mit Hilfe des PHYLIP-Pakets mit Standardeinstellungen erstellt (Felsenstein, 1989).

#### 4.2.3 Mögliche Ursachen der Bastardbleichheit

In der Arbeit von Metzlaff (1983) wurde ein Sequenzunterschied in der 5' Region der 5SrRNA festgestellt, der eine EcoRI-Erkennungsstelle in den Plastidgenomtypen I und II erzeugte. Die Ursache der Bastardbleichheit wurde anschließend in einer verringerten Transkriptionsinitiationseffizienz der 5S ribosomalen RNA in diesen Plastidentypen vermutet, falls die Mutation direkt in der Bindungsstelle der RNA-Polymerase liegt. Es wurde angenommen, dass das Typ R-Plastidengenom so einen Vorteil gegenüber den Typ I und II Plastiden besaß. Delp und Kössel (1991) sowie Vera und Sugiura (1995) zeigten jedoch, dass die Transkription der rRNA im Rahmen eines Operons durchgeführt wird. Ein langes hexacistronisches Transkript - rrn16-trnI-trnA-rrn23-rrn4,5-rrn5 - wird erzeugt, das auf die Transkription folgend prozessiert wird (Bollenbach et al., 2005). Es erfolgt somit keine separate Transkriptionsinitiation 5' des rrn5-Gens. Zusätzlich konnten mit Hilfe der in dieser Arbeit durchgeführten Sequenzierungen keine Sequenzunterschiede zwischen Typ Rund Typ I- bzw. II-Plastidengenomen in der genannten Region (Metzlaff, 1983) ermittelt werden. Es konnten ausschließlich Einzelnukleotidaustausche im Intron des trnA-Gens, 5' des trnI-Gens und innerhalb des rrn16-Gens ermittelt werden (Tab. 3.11 und 3.12). Zusätzlich zu den fehlenden Nukleotidaustauschen konnte keine EcoRI-Erkennungsstelle in der Region 5' des rrn5-Gens identifiziert werden. Ein Artefakt in zwei Klonierungen der plastidären Sequenzen von Metzlaff (1983) kann als ebenso unwahrscheinlich gelten wie Punktmutationen in zwei Plastidengenomen an dieser Stelle in der Zeit seit der Arbeit von Metzlaff (1983), da in Plastiden niedrige Mutationsraten beobachtet wurden (Guhamajumdar und Sears, 2005; Khakhlova und Bock, 2006). Es konnte allerdings festgestellt

werden, dass in *Geraniaceae* die Rate nicht-stiller Mutationen im Plastidengenom im Vergleich zu anderen Angiospermen erhöht ist. Dies beschränkt sich jedoch wiederum auf Untergruppen der plastidär kodierten Gene, wie z.B. die *rpo-* und *atp-*Gene (Guisinger *et al.*, 2008).

Der Phänotyp des bastardbleichen Materials zeigte eine bleiches Gewebe schon zu Beginn der Blattentwicklung und resultierte in völlig weißem Material (Abb. 1.3, Metzlaff *et al.* (1982)). Bisher sind nur wenige Mutationen bekannt, die einen ähnlichen Phänotyp verursachen. Die Deletion von Genen, deren Produkte die plastidäre ATP-Synthase aufbauen (*atpB*, *atpH*; Hager, 2002, persönliche Mitteilung Ralph Bock) und die der RNA-Polymerase (alle *rpo*-Gene; Santis-MacIossek *et al.*, 1999; Serino und Maliga, 1998) sind Beispiele hierfür. Im Gegenteil hierzu erzeugen Deletionsmutanten, die z.B. die Photosysteme betreffen, keine vollständig weißen Phänotypen unter Schwachlicht (Baena-González *et al.*, 2003; Hager *et al.*, 1999; Ruf *et al.*, 1997).

In der Betrachtung einzelner Nukleotidaustausche zeigte sich u.a. auch eine Reihe von Mutationen in Genen, die als mögliche Ursache für den bastardbleichen Phänotyp in Frage kommen. Unter anderem wurden Unterschiede in den Genen der ATPase (atp), der RNA-Polymerase (rpo) und ribosomalen Untereinheiten (rps/rpl) ermittelt. Eine hohe Mutationsrate der rpo-Gene konnte ebenfalls von Guisinger *et al.* (2008) beobachtet werden.

In den Genen, deren Produkte an der Bildung der RNA-Polymerase beteiligt sind, konnte zusätzlich zu Nukleotidaustauschen eine Vielzahl von Insertionen und Deletionen beobachtet werden (Tab. 3.11). So wurden z.B. im Gen rpoC1 Längenpolymorphismen von 24 nt Deletionen und 9 nt Insertionen ermittelt. Eine gestörte Interaktion der Typ I- und II-Untereinheiten der RNA-Polymerase mit kernkodierten Typ R-Sigmafaktoren könnte eine Ursache für eine gestörte Transkription sein. Hierbei müsste jedoch davon ausgegangen werden, dass die kernkodierten Sigmafaktoren des Typs Typ I- und II ihre Funktion nicht mehr ausführen können, bzw. diese Allele deaktiviert wurde (Brutnell und Dellaporta, 1994), was eher unwahrscheinlich erscheint. Es kann jedoch aufgrund des dominantnegativen Effekts nicht von einem allgemeinen Prinzip ausgegangen werden, dass Insertionen oder Deletionen in den rpo-Genen zu dem beschriebenen Phänotyp führen. Die Deletion von drei Codons im rpoC2-Gen führte in N. tabacum zu keinem erkennbaren Phänotyp (Schmitz-Linneweber et al., 2005a). Die Deletion diverser vollständiger rpo-Gene führte hingegen zu einen Albinophänotyp (Allison et al., 1996; Santis-MacIossek et al., 1999; Serino und Maliga, 1998). Aus diesem Grund ist dieser Proteinkomplex ein lohnendes Ziel weiterer Untersuchungen.

Weiterhin wurden diverse Nukleotidaustausche in Genen ermittelt, deren Produkte am Aufbau der Ribosomen beteiligt sind. Die Entfernung plastidärer Ribosomen hat in verschiedenen Spezies unterschiedliche Auswirkungen. So sind plastidäre Ribosomen und damit plastidäre Translation in Tabak essentiell für die Zellteilung (Ahlert *et al.*, 2003; Rogalski *et al.*, 2006), wohingegen die Zerstörung plastidärer Ribosomen in Roggen (Feierabend und Schrader-Reichhardt, 1976) und weitere *Gramineae* (Maier *et al.*, 1995) sowie Raps (Zubko und Day, 2002) nur zum Ausbleichen des Blattmaterials führte, jedoch nicht zur Einstellung des Wachstums. Aufgrund der Substitution einer plastomkodierten Acetyl-CoA-Carboxylase durch eine kernkodierte wird vermutet, dass aus diesem Grund aktive plastidäre Translation in diesen Spezies nicht essentiell ist (Maier *et al.*, 1995; Rogalski *et al.*, 2006). Da in *Pelargonium* kein *accD*-Gen im Plastidengenom ermittelt werden konnte, besteht somit die Möglichkeit, dass die plastidäre Translation durch Inkompatibilität von plastiden- und kernkodierten ribosomalen Untereinheiten in bastardbleichem Material stark beeinträchtigt ist.

Die Deletion der Gene *atpB* oder *atpH* führte zur vollständigen Zerstörung des ATP-Synthase-Proteinkomplexes (Hager, 2002, persönliche Mitteilung Ralph Bock). Eine Erklärung für den dramatischen Phänotyp, d.h. die Entwicklung bleichen Materials, konnte bisher nicht ermittelt werden. Ein ähnlicher Phänotyp konnte bei somatischen Hybriden zwischen Atropa belladonna und N. tabacum gefunden werden (Kushnir et al., 1991). Hier zeigte sich ebenfalls ein weißer Phänotyp in Laubblättern von Cybriden, die N. tabacum-Plastiden und das A. belladonna-Kerngenom enthielten. Die Ursache hierfür wurde von Schmitz-Linneweber et al. (2005a) in fehlender Edierung des atpA-Transkripts gefunden. Hierdurch ergab sich eine fehlende Überführung eines CCC-(Pro)-Codons in ein CUC-(Leu)-Codon, wobei im A. belladonna-Plastidengenom bereits ein CTC-(Leu)-Codon auf DNA-Ebene enthalten ist. Hierdurch ergibt sich keine Notwendigkeit, kernkodierte Edierungsfaktoren für diese Edierungsstelle im A. belladonna-Kerngenom vorzuhalten. Die fehlende Prozessierung resultiert so in einer Substitution einer apolaren Aminosäure (Leu) durch einen Helixbrecher (Pro). Die Ursache dieser Plastom-Genom-Inkompatibilität ist somit vermutlich eine gestörte Protein-Protein-Wechselwirkung, die zur Einstellung der Aktivität der ATP-Synthase führt. Somit zeigt sich neben der RNA-Polymerase eine weitere Möglichkeit auf, wie eine modifizierte Aminosäuresequenz zu einer Inkompatibilität zwischen Plastid und Kern führen kann.

Am Beispiel der Inkompatibilität zwischen *N. tabacum*-Plastiden und *A. belladonna*-Kerngenom konnte gezeigt werden, welche Rolle RNA-Edierung spielen kann. RNA-Edierung stellt eine Form der RNA-Prozessierung dar und resultiert in einer Abweichung der reifen mRNA von der auf DNA-Ebene enthaltenen Sequenz.

In Mitochondrien von Protozoen entdeckt (Benne *et al.*, 1986), konnte RNA-Edierung auch in Plastiden nahezu aller Pflanzen nachgewiesen werden (Freyer *et al.*, 1997; Hoch *et al.*, 1991). Hier kommt es in höheren Pflanzen hauptsächlich zu einer Desaminierung von Cytosin zu Uracil, wodurch sowohl evolutionär konservierte Codons als auch Startund Stopcodons wieder hergestellt werden können (Bock *et al.*, 1996; Freyer *et al.*, 1993; Kudla *et al.*, 1992; Maier *et al.*, 1992). Die Identität der Edierungsfaktoren bzw. der die Spezifität vermittelnden Faktoren war lange unklar, obwohl früh klar wurde, dass es sich um kernkodierte Faktoren handeln müsse (Bock und Koop, 1997; Zeltz *et al.*, 1993). Die enzymatische Aktivität wird vermutlich durch kernkodierte Desaminasen vermittelt (Shikanai, 2006). Diese binden jedoch wahrscheinlich nicht direkt an die Zielsequenz in der RNA. Die Sequenzspezifität wird durch kernkodierte RNA-Bindeproteine vermittelt, welche unter anderem durch "pentatricopeptid repeat" (PPR)-Domänen sequenzspezifische Bindungen mit der RNA eingehen (Kotera *et al.*, 2005; Schmitz-Linneweber *et al.*, 2005b). Es konnte gezeigt werden, dass die Erkennungssequenzen dieser Proteine in der RNA 5' der Prozessierungsstelle liegen und spezifisch für einen oder einige wenige Edierungsorte im Plastom sind (Bock *et al.*, 1996; 1997; Karcher *et al.*, 2008).

Der Einfluss von PPR-Proteinen auf die RNA-Edierung zeigt sich am Beispiel des Proteins CLB19, das in die Edierung des rpoA-Transkripts involviert ist (Chateigner-Boutin *et al.*, 2008). Eine fehlende Edierung dieses Transkripts führte zu einem Albinophänotyp, vergleichbar mit den Beobachtungen bei fehlender Edierung bzw. deletierten rpo-Genen (Schmitz-Linneweber *et al.*, 2005a; Allison *et al.*, 1996; Santis-MacIossek *et al.*, 1999; Serino und Maliga, 1998). Zeltz *et al.* (1993) konnten in Mais und Gerste zeigen, dass auch mindestens ein weiteres Transkript der plastidenkodierten RNA-Polymerasegene ediert wurde. Hierzu zählte das Transkript rpoB, das von kernkodierten Faktoren modifiziert wurde, wohingegen für rpoC1 keine Edierung nachgewiesen werden konnte.

Die Rolle der PPR-Proteine findet sich jedoch nicht nur in der Edierung von Transkripten plastidärer Gene, sondern auch in der Transkriptprozessierung. So konnten Meierhoff *et al.* (2003) zeigen, dass in *Arabidopsis thaliana* HCF152, ein PPR-Protein, an der Spaltung des pentacistronischen Transkripts *psbB-psbT-psbH-petB-petD* beteiligt ist. Für *Chlamy-domonas* konnte ebenfalls ein Protein gefunden werden, das in die Prozessierung dieses pentacistronischen Transkripts involviert ist. Bisher wurde jedoch nicht untersucht, ob es sich hier um ein PPR-Protein handelt (Drager *et al.*, 1998).

In den untersuchten *Pelargonium*-Plastidengenomen konnten auch einige Sequenzunterschiede in den Genen, deren Produkte am Aufbau der ATPase beteiligt sind, identifiziert werden (Tab. 3.11). Voraussetzung für RNA-Edierung als Ursache der in dieser Arbeit beobachteten Bastardbleichheit wäre ein nicht stiller Sequenzunterschied  $T \rightarrow C$  im Vergleich Plastidentyp R zu den Typen I und II. Eine im Kerngenom von *P. roseum* kodierte Desaminase könnte so in den Plastiden der Typen I und II das vorhandene Cytosin desaminieren und dadurch die kodierende Region derart verändern, dass das resultierende Genprodukt schwerwiegend in seiner Funktion bzw. in der Wechselwirkung mit anderen Genprodukten gestört ist. Diese Sequenzunterschiede konnten jedoch in den *atp*-Genen nicht identifiziert werden (Tab. A.1).

Ein alternativer Ansatz ist die Bildung einer neuen Bindestelle in einem Transkript der Plastidentypen I und II, die zu einer zusätzlichen Aktivität eines im *P. roseum*-Kerngenom kodierten Edierungsfaktors und damit zur "Fehledierung" führt. Diese Edierung kann anschließend ebenso wie die Edierung eines unkonservierten Nukleotids in Fehlfunktionen resultieren. Denkbare Konsequenzen sind die Herstellung falsch lokalisierter Startcodons, Codons für Aminosäuren, die Funktionsstörungen hervorrufen, oder vorzeitige Stopcodons. Es konnte gezeigt werden, dass Edierung zur Herstellung dieser Codons in einigen

101

plastidären Transkripten vorhanden ist und auch notwendig zur Herstellung funktionaler Transkripte ist (Neckermann *et al.*, 1994; Sasaki *et al.*, 2003; Bock *et al.*, 1994; Sasaki *et al.*, 2001; Wintz und Hanson, 1991). Auffällig ist die nahe Verwandtschaft der untersuchten Arten, sodass RNA-Edierung als Ursache für die Inkompatibilität des Plastiden mit dem Kerngenom schwer vorstellbar erscheint. Allerdings konnte von Freyer *et al.* (1995) gezeigt werden, dass nah verwandte Arten bereits unterschiedliche Edierungsmuster besitzen. Weiterhin ist gezeigt worden, dass in *Geraniaceae* die Mutationsrate in einigen Genen im Vergleich zu anderen Gattungen erhöht ist (Guisinger *et al.*, 2008). Es ist allerdings wahrscheinlich, dass hohe Mutationsraten und Veränderungen in Edierungsstellen essentieller Gene deutlich seltener auftreten als in Genen, deren Produkte nicht essentiell sind (Fiebig *et al.*, 2004).

Eine Vielzahl von RNA-Bindeproteinen und das geringe Wissen über deren Erkennungssequenzen und Domänenstruktur, die als Bindeplattform für eine Desaminase als mögliches Edierungsenzym dienen könnten, erschweren die Suche nach diesen Bindestellen (Schmitz-Linneweber und Barkan, 2007; Bock, 2001). Eine ungerichtete Suche nach Unterschieden zwischen der Transkript- und DNA-Sequenz in Genen, deren Produkte am Aufbau der ATP-Synthase oder der RNA-Polymerase beteiligt sind, könnte den möglichen Einfluss fehlerhafter Edierung auf die Bastardbleichheit aufklären.

RNA-Edierung stellt jedoch nur eine Form der RNA-Prozessierung dar. Sequenzunterschiede in den Plastidengenomen könnten ebenso zu einer Erkennungsstelle für Endonukleasen führen. Die Spaltung eines Transkripts in den Plastidentypen I und II durch eine Nuklease bzw. aufgrund der Bindung eines RNA-Bindeproteins, das im *P. roseum*-Kerngenom kodiert ist, hätte ebenso einen dominant-negativen Phänotyp zur Folge. Die Suche nach anormalen Spaltprodukten der genannten Transkripte kann hier künftig zur Aufklärung führen.

## 4.2.4 Anwendung des Dobzhansky-Muller-Modells auf Plastom-Genom-Inkompatibilität

Für inkompatible Kerngenome konnten bereits detaillierte Resultate zur Ursache der Inkompatibilität gewonnen werden. So zeigten Brideau *et al.* (2006), dass Hybridpopulationen der Arten *Drosophila simulans* und *D. melanogaster* keine männlichen Tiere enthalten, sobald es zur Kombination der Wildtypgene *Lhr/Hmr* ("*Lethal hybrid rescue"/*"*Hybrid male rescue"*) kommt. Die Kombination beider Gene in einem Hybrid führt zu einem dominant-negativen embryolethalen Effekt, indem Hirnzellen der betroffenen Embryonen in der Zellteilung behindert waren (Bolkan *et al.*, 2007). Hinweise auf den Einfluss dieser Proteine auf die Zellteilung begründen sich auf der Interaktion mit chromatinbindenden Proteinen durch Protein-Protein-Wechselwirkungen. Bisher konnte der genaue Mechanismus der Inkompatibilität jedoch nicht aufgeklärt werden. Mutationen in einem der beiden Gene führen zur wiederhergestellten Kompatibilität beider Arten (Brideau *et al.*, 2006). Hier zeigt sich die Adaptation von genetischen Systemen, die isoliert keine negativen Folgen für die Hybride entfaltet. Kommt es jedoch zu einer Kombination der beiden Merkmale, erfolgt eine Reduktion der Fitness der Hybriden. Dieser Effekt in der Speziesbildung wurde von Bateson, Dobzhansky und Muller beschrieben (Bateson, 1909; Dobzhansky, 1936; Muller und Pontecorvo, 1940).

Weniger dramatische Effekte konnten für Hybride der Arten Arabidopsis thaliana und A. arenosa ermittelt werden. Hier kam es in den Hybriden zu einer Veränderung der regulatorischen Netzwerke. Es konnte beobachtet werden, dass das Transkriptprofil der Hybride eher dem von A. arenosa ähnelte als dem von A. thaliana (Wang et al., 2006). Es konnte jedoch keine Genominkompatibilität beobachtet werden. Hier zeigt sich die mögliche Anwendung des Turrelli-Orr-Modells, das eine Entstehung verschiedener Inkompatibilitätssysteme vorschlägt, die in Kombination letztendlich zur Genominkompatibilität führen (Johnson, 2000; Landry et al., 2007). Die sich entfaltende Genominkompatibilität führt letztendlich zu einer genetischen Trennung von Subpopulationen und somit zur Speziesbildung bzw. zur Aufrechterhaltung von Speziesgrenzen (Bomblies und Weigel, 2007; Bomblies, 2006).

Deutlich dramatischere Effekte konnten bei der Untersuchung von Hybriden zwischen verschiedenen Akzessionen von *A. thaliana* beobachtet werden. Hier kam es zur Entwicklung nekrotischer Phänotypen, wenn bestimmte Loci miteinander in der Hybride kombiniert wurden. Es konnte gezeigt werden, dass in diesen Loci kodierende Sequenzen für Proteine (NB-LRR) enthalten sind, die in der Pathogenabwehr durch Nekrose eine Rolle spielen. Offensichtlich kommt es zu einer fehlgeleiteten Interaktion von zwei jeweils an die Ursprungssysteme koadaptierten Proteinen, die in Kombination gebracht ungerichtet Nekrose auslösen (Bomblies *et al.*, 2007).

Die Trennung von Subpopulationen ist in Reis (Oryza sativa) ebenfalls zu erkennen. Diese Art fasst zwei Unterarten (*indica* und *japonica*) zusammen, die jeweils eine große Anzahl Kultivare stellen. Bei der Kreuzung einiger Kultivare konnte eine Verringerung der Fitness durch verminderte Samenbildung beobachtet werden. Als Ursache wurde eine Genominkompatibilität basierend auf der negativen Interaktion der Gene hwh1 und hwh2 ermittelt (Jiang et al., 2008). Die Gene zeigten Homologien zu Oxidoreduktasen bzw. Hexosetransportern, wobei bisher keine Interaktion solcher Proteine beobachtet wurde. Aus diesem Grund kann über einen Mechanismus zur Entstehung der Genominkompatibilität nur vage spekuliert werden. Inwiefern ähnliche Ergebnisse von Yamamoto et al. (2007) sowie Matsubara et al. (2007) die gleichen Gene betreffen ist ebenso unklar (Jiang et al., 2008). In Folge des Endosymbioseereignisses fand ein Gentransfer vom Endosymbionten in den Zellkern statt. Gleichzeitig bestand die Anforderung an den Kern die Lebensfähigkeit des akquirierten Organells aufrecht zu erhalten und die metabolische Kontrolle zu übernehmen. Hierfür bildete sich ein komplexes Netzwerk aus anterograden und retrograden Signalen (Bräutigam et al., 2007) sowie ein Transport von kernkodierten Proteinen in den Plastiden heraus (Richly und Leister, 2004; Sun et al., 2004). Im Laufe dieses Prozesses

kam es zu einer Koadaptation von Kern und Organellen.

Die beobachtete Plastom-Genom-Inkompatibilität weist ebenso Merkmale der Dobzhansky-Muller-Inkompatibilität zwischen verschiedenen Spezies auf, wobei es zu einer Inkompatibilität zwischen Genomen kommt, die in verschiedenen Zellkompartimenten vorliegen. So kam es zur Inkompatibilität in Hybriden zwischen P. roseum (Typ R) und P. zonale cv. Stadt Bern (Typ I) bzw. P. zonale cv. Trautlieb (Typ II), jedoch nicht in Hybriden zwischen P. zonale cv. Stadt Bern und P. zonale cv. Trautlieb (Metzlaff, 1983). Zusätzliche Hybridisierungen in der Gattung Pelargonium zwischen Pelargonium zonale und P. inquinans führten zur Beobachtung von Bastardbleichheit (Pohlheim, 1986). Ahnliche Ergebnisse lieferten die Hybridisierungen von P. inquinans  $\times$  P. stenopetalum und *P. zonale*  $\times$  *P. stenopetalum* (Harney und Chow, 1971), womit Genominkompatibilität ein weit verbreitetes Phänomen in der Gattung Pelargonium ist und in der leicht zu hybridisierenden Gattung Speziesgrenzen aufrechterhält. Somit eignet sich die Gattung Pelargonium für weitere Untersuchungen der Plastom-Genom-Inkompatibilität, wobei diverse Kandidatengene in Form der atp- und rpo-Gene identifiziert wurden. Als Mechanismus für die Dobzhansky-Muller-Inkompatibilität ist z.B. eine fehlerhafte RNA-Prozessierung denkbar.

## 4.2.5 Zukünftige Experimente zur Aufklärung der Mechanismen der Bastardbleichheit

In dieser Arbeit wurde mit Hilfe der Sequenzierung von drei Plastidengenomen der Gattung *Pelargonium* die Grundlage für detaillierte Untersuchungen zur Aufklärung des Mechanismus der Bastardbleichheit in *Pelargonium* gelegt. Weitere Experimente sollten sich nun auf die nähere Untersuchung von RNA-Prozessierungsunterschieden in den drei Plastidentypen I, II und R konzentrieren. Hierbei sollten die Gene, deren Produkte am Aufbau der RNA-Polymerase und der ATP-Synthase im Vordergrund stehen. Aufgrund der bekannten plastidären Expressionsmuster von N. tabacum-Deletionsmutanten, die die RNA-Polymerase bzw. ATP-Synthase betreffen, sollten vergleichende Untersuchungen von bastardbleichem Material zu diesen Mutanten Aufschlüsse über die molekulare Ursache der Bastardbleichheit liefern. Hierfür können "Microarrays" für plastidäre Transkripte genutzt werden (Kahlau und Bock, 2008). Zusätzlich können Vergleiche der auf Genomebene kodierten und der in den Transkripten vorgefundenen Nukleotidsequenz Rückschlüsse auf Edierungsunterschiede liefern. Weiterhin liefern vergleichende Untersuchungen zur Transkriptlänge zwischen Transkripten aus Typ I- bzw. II-Plastiden und bastardbleichem Material Hinweise zu Effekten, die durch fehlerhafte Prozessierung ausgelöst werden. Potentielle Kandidaten können durch Komplementationsanalysen mit Hilfe des Typ R-Gens abschließend untersucht werden. Hierfür muss aufgrund fehlender Plastidentransformationsprotokolle auf die transiente Kerntransformation zurückgegriffen werden.

Ein weiterer interessanter Aspekt ist die Lokalisierung der RpoA-kodierenden Region. Es

ist unklar inwiefern die ermittelten homologen Bereiche in allen drei Plastidengenomen funktionale Proteine bilden oder nach Gentransfer diese kodierende Region im Kerngenom lokalisiert ist. Ähnliches gilt für die Acetyl-CoA-Carboxylase. Hier ist unklar, ob es zu einem Gentransfer des *accD*-Gens kam oder eine andere Isoform die Funktion des plastidären Proteins übernahm. Als erster Hinweis zur Aufklärung der Lokalisation dieser Gene, können deren kodierende Sequenzen im Kerngenom amplifiziert werden. Zusätzlich können Cytosol und Plastiden auf Transkripte beider Gene, unterschieden durch den poly(A)-Schwanz, untersucht werden. Weiterhin können zum Nachweis einer ausschließlich kernkodierten Acetyl-CoA-Carboxylase eukaryotischen Typs Inhibitorstudien z.B. mit Graminiciden (Sasaki *et al.*, 1995) durchgeführt werden.

## 5 Zusammenfassung

#### Translationsinitiation in E. coli und N. tabacum-Plastiden

Die Genexpression ist ein hochgradig auf mehreren Stufen regulierter Prozess. Die prokaryotische Genexpression ist besonders auf Ebene der Translationsinitiation reguliert, indem eine Vielzahl von Komponenten zusammenwirkt, um das Ribosom am Startcodon zu positionieren. Hierbei kommt konservierten Sequenzen in der untranslatierten Region (5' UTR) prokaryotischer Transkripte eine wichtige Rolle zu. Diese Shine-Dalgarno-(SD)-Sequenzen sind sowohl in ihrer Sequenz als auch in ihrem Abstand zum Startcodon in Bakterien konserviert. Eine wichtige Rolle der SD-Sequenzen, wie in der Ribosomenpositionierung in Bakterien, wurde für das prokaryotische System der plastidären Genexpression angenommen, obwohl hier weder Nukleotidsequenz noch der Abstand zum Startcodon vergleichbar stark konserviert sind. Bisher wurden widersprüchliche Daten zur Rolle der SD-Sequenz in Plastiden ermittelt.

Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle der SD-Sequenz in der Translationsinitiation detailliert zu untersuchen, um weitere Rückschlüsse auf den Initiationsmechanismus in *E. coli* und *N. tabacum*-Plastiden ziehen zu können. Zur näheren Untersuchung des Mechanismus der plastidären Translationsinitiation wurde eine Vielzahl von DNA-Konstrukten hergestellt. Diese enthielten vervielfachte SD-Sequenzen in der 5' UTR, um Ribosomen eine größere Anzahl an Bindestellen zur Verfügung zu stellen. Weitere Konstrukte enthielten kleine offene Leseraster in der 5' UTR, was die Eigenschaften eines polycistronischen Transkripts nachempfand. Wiederum andere Konstrukte enthielten mehrfache Initiationsstellen für die Translation eines Reporterproteins.

in vivo-Untersuchungen des Einflusses der SD-Sequenzen der Konstrukte auf die Expression des Reportergens GFP wurden in *E. coli* und *N. tabacum*-Plastiden durchgeführt. Hierbei konnten wesentliche Unterschiede in der Translationsrate des Reporterproteins ermittelt werden. Es zeigte sich, dass in beiden untersuchten Systemen die Initiationseffizienz der Translation durch eine Vervielfachung von Ribosomenbindestellen gesteigert werden kann. Deutlich stärker ist der Einfluss von vervielfältigten Translationsstartsstellen (SD-Sequenz + Startcodon). Hier stieg in beiden Organismen die Translationsrate des Reportertranskripts im Vergleich zur Referenz deutlich stärker an als bei Vervielfachung der Ribosomenbindestellen.

Zusätzlich wurden Unterschiede im Mechanismus der Erkennung der Initiationsstellen deutlich. In Chlorplasten konnte eine Bevorzugung der ersten von aufeinanderfolgenden
Initiationsstellen erkannt werden, wohingegen in *E. coli* eine gleichmäßige Nutzung beobachtet wurde. Damit zeigte sich, dass die den Prokaryoten nahe stehende Genexpressionsmaschinerie des Plastiden teilweise eukaryotische Eigenschaften erworben hat, indem ein dem "Scanning" eukaryotischer Ribosomen ähnlicher Prozess beobachtet werden konnte. Der Erwerb dieser Eigenschaft lief offenbar parallel zur Weiterentwicklung der Prozessierung polycistronischer Transkripte. In Bakterien werden diese Transkripte noch als Einheit von Ribosomen erkannt und translatiert, wohingegen in Plastiden die Spaltung der Transkripte in einzelne Cistrone erfolgt und anschließend eine zuverlässige Translation ermöglicht wird.

## Untersuchungen der Bastardbleichheit in der Gattung Pelargonium

In der Gattung *Pelargonium* wird eine große Anzahl von Arten beobachtet, welche untereinander leicht kreuzbar sind. In Hybriden konnten Individuen mit partiellen Ausbleichungen, einem variegiertem Phänotyp, isoliert werden. Dieses Phänomen wurde als Bastardbleichheit bezeichnet und beruht auf biparentaler Plastidenvererbung. Hybride enthalten die Plastiden beider Elternpflanzen, wobei es zum Verlust der Ergrünungsfähigkeit von Plastiden eines Elters in der Hybride kommen kann. Bei gleichem heterozygoten Kerngenom entwickelt sich jedoch die Plastidenspezifische Plastom-Genom-Inkompatibilität zu beobachten, die sich negativ auf die Fitness der Hybride auswirkt. Die beobachtete Inkompatibilität führt damit zu einer gewissen Abgrenzung der Spezies voneinander. Welcher molekulare Mechanismus diesem Phänomen zugrunde liegt, ist bisher nicht bekannt.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Grundlage der Plastom-Genom-Inkompatibilität näher untersucht werden, um einen Einblick in den Aufbau bzw. die Erhaltung von Artgrenzen zu gewinnen. Da es sich bei der Bastardbleichheit um einen plastidenspezifischen Effekt handelt, muss die Ursache der Inkompatibilität in der Nukleotidsequenz der Plastidengenome zu finden sein. Aus diesem Grund wurden die Nukleotidsequenzen der Genome der betroffenen sowie des ergrünungsfähigen Plastiden ermittelt. Es konnte eine Vielzahl von Sequenzunterschieden erkannt werden. Hierzu zählten neben Einzelnukleotidaustauschen eine Reihe von Insertionen und Deletionen, die vornehmlich in intergenischen Regionen auftraten. Kodierende Sequenzen wiesen einen hohen Grad an Konservierung auf. Dennoch konnten in Genen, deren Produkte am Aufbau der ATP-Synthase und der RNA-Polymerase beteiligt sind, eine Vielzahl von Mutationen ermittelt werden. In der Literatur sind bereits Deletionsmutanten dieser Gene beschrieben, die ähnliche Phänotypen zeigen wie das bastardbleiche Material. Diese Gene wurden als Kandidaten für zukünftige Untersuchungen ausgewählt.

Als molekulare Mechanismen kommen eine fehlerhafte RNA-Prozessierung der Transkripte dieser Gene ebenso in Frage wie eine gestörte Interaktion von kern- und plastidenkodierten Untereinheiten der Proteinkomplexe.

## Literaturverzeichnis

- Agaisse H und Lereclus D. STAB-SD: a Shine-Dalgarno sequence in the 5' untranslated region is a determinant of mRNA stability. *Mol. Microbiol.*, 20(3):633-643 (1996).
- Ahlert D, Ruf S und Bock R. Plastid protein synthesis is required for plant development in tobacco. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 100(26):15730-15735 (2003).
- Alexander C, Faber N und Klaff P. Characterization of protein-binding to the spinach chloroplast *psbA* mRNA 5' untranslated region. *Nucl. Acids Res.*, 26(10):2265–2272 (1998).
- Allison LA. The role of sigma factors in plastid transcription. Biochimie, 82(6-7):537-548 (2000).
- Allison LA, Simon LD und Maliga P. Deletion of *rpoB* reveals a second distinct transcription system in plastids of higher plants. *EMBO J*, 15(11):2802–2809 (1996).
- Antoun A, Pavlov MY, Lovmar M und Ehrenberg M. How initiation factors tune the rate of initiation of protein synthesis in bacteria. *EMBO J*, 25(11):2539–2550 (2006).
- Baena-González E, Allahverdiyeva Y, Svab Z, Maliga P, Josse EM, Kuntz M, Mäenpää P und Aro EM. Deletion of the tobacco plastid *psbA* gene triggers an upregulation of the thylakoid-associated NAD(P)H dehydrogenase complex and the plastid terminal oxidase (PTOX). *Plant J*, 35(6):704–716 (2003).
- Balmer Y, Koller A, Val GD, Schürmann P und Buchanan BB. Proteomics uncovers proteins interacting electrostatically with thioredoxin in chloroplasts. *Photosynth. Res.*, 79(3):275–280 (2004).
- Barkan A. Proteins encoded by a complex chloroplast transcription unit are each translated from both monocistronic and polycistronic mRNAs. *EMBO J*, 7:2637–2644 (1988).
- Barkan A. Nuclear Mutants of Maize with Defects in Chloroplast Polysome Assembly Have Altered Chloroplast RNA Metabolism. *Plant Cell*, 5(4):389–402 (1993).
- Barkan A, Walker M, Nolasco M und Johnson D. A nuclear mutation in maize blocks the processing and translation of several chloroplast mRNAs and provides evidence for the differential translation of alternative mRNA forms. *EMBO J*, 13(13):3170–3181 (1994).
- Barneche F, Winter V, Crèvecoeur M und Rochaix JD. ATAB2 is a novel factor in the signalling pathway of light-controlled synthesis of photosystem proteins. *EMBO J*, 25(24):5907–5918 (2006).
- Barnes D, Franklin S, Schultz J, Henry R, Brown E, Coragliotti A und Mayfield SP. Contribution of 5'- and 3'-untranslated regions of plastid mRNAs to the expression of Chlamydomonas reinhardtii chloroplast genes. *Mol Gen Genet*, 274(6):625–636 (2005).
- Barnes D und Mayfield SP. Redox control of posttranscriptional processes in the chloroplast. Antioxidants & Redox Signaling, 5(1):89-94 (2003).
- Barraud P, Schmitt E, Mechulam Y, Dardel F und Tisné C. A unique conformation of the anticodon stem-loop is associated with the capacity of tRNAfMet to initiate protein synthesis. *Nucl. Acids Res.*, 36(15):4894-4901 (2008).
- Barrick D, Villanueba K, Childs J, Kalil R, Schneider TD, Lawrence CE, Gold L und Stormo GD. Quantitative analysis of ribosome binding sites in E.coli. *Nucl. Acids Res.*, 22(7):1287–1295 (1994).
- Bateson W. Darwin and Modern Science, Kap. Heredity and variation in modern lights, 85–101. Cambridge Univ. Press (1909).

- Baur E. Das Wesen und die Erblichkeitsverhältnisse der "Varietates albomarginnatae hort"von Pelargonium zonale. Z. Vererbungslehre, 330–351 (1909).
- Beligni MV, Yamaguchi K und Mayfield SP. The translational apparatus of *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast. *Photosynth. Res.*, 82(3):315–325 (2004).
- Benne R, den Burg JV, Brakenhoff JP, Sloof P, Boom JHV und Tromp MC. Major transcript of the frameshifted *coxII* gene from trypanosome mitochondria contains four nucleotides that are not encoded in the DNA. *Cell*, 46(6):819–826 (1986).
- Bergann F und Bergann L. Über experimentell ausgelöste vegetative Spaltungen und Umlagerungen an chimärischen Klonen, zugleich als Beispiele erfolgreicher Staudenauslese. *Theoretical and Applied Genetics*, 29:361–374 (1959).
- Betts L und Spremulli LL. Analysis of the role of the Shine-Dalgarno sequence and mRNA secondary structure on the efficiency of translational initiation in the *Euglena gracilis* chloroplast *atpH* mRNA. J Biol Chem, 269(42):26456–26463 (1994).
- Bhattacharya D und Medlin L. Algal Phylogeny and the Origin of Land Plants. *Plant Physiol*, 116:9–15 (1998).
- Birnboim HC und Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucl. Acids Res., 7(6):1513–1523 (1979).
- Blobel G und Sabatini D. Dissociation of Mammalian Polyribosomes into Subunits by Puromycin. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 68(2):390-394 (1971).
- Bock R. RNA Editing, Kap. RNA editing in plant mitochondria and chloroplasts, 38–60. Oxford University Press (2001).
- Bock R. Cell and Molecular Biology of Plastids, vol. 19, Kap. Structure, function, and inheritance of plastid genomes, 29–63. Springer Berlin Heidelberg (2007).
- Bock R, Hermann M und Fuchs M. Identification of critical nucleotide positions for plastid RNA editing site recognition. *RNA*, 3(10):1194–1200 (1997).
- Bock R, Hermann M und Kössel H. In vivo dissection of cis-acting determinants for plastid RNA editing. EMBO J, 15(18):5052–5059 (1996).
- Bock R und Khan MS. Taming plastids for a green future. Trends Biotechnology, 22(6):311-318 (2004).
- Bock R und Koop HU. Extraplastidic site-specific factors mediate RNA editing in chloroplasts. *EMBO* J, 16(11):3282–3288 (1997).
- Bock R, Kössel H und Maliga P. Introduction of a heterologous editing site into the tobacco plastid genome: the lack of RNA editing leads to a mutant phenotype. *EMBO J*, 13(19):4623-4628 (1994).
- Boelens R und Gualerzi CO. Structure and Function of Bacterial Initiation Factors. Curr. Protein Pept. Sci., 3:107–119 (2002).
- Bolkan BJ, Booker R, Goldberg ML und Barbash DA. Developmental and cell cycle progression defects in Drosophila hybrid males. *Genetics*, 177(4):2233–2241 (2007).
- Bollenbach TJ, Lange H, Gutierrez R, Erhardt M, Stern DB und Gagliardi D. RNR1, a 3'-5' exoribonuclease belonging to the RNR superfamily, catalyzes 3' maturation of chloroplast ribosomal RNAs in *Arabidopsis thaliana. Nucl. Acids Res.*, 33(8):2751–2763 (2005).
- Bomblies K. Hybrid incompatibility: when opposites attract with a fatal outcome. *Curr. Biol.*, 16(14):R542–R544 (2006).
- Bomblies K, Lempe J, Epple P, Warthmann N, Lanz C, Dangl JL und Weigel D. Autoimmune response as a mechanism for a Dobzhansky-Muller-type incompatibility syndrome in plants. *PLoS Biol.*, 5(9):e236 (2007).

- Bomblies K und Weigel D. Arabidopsis: a model genus for speciation. Curr. Opin. Genet. Dev., 17(6):500–504 (2007).
- Boni IV, Artamonova VS und Dreyfus M. The last RNA-binding repeat of the *Escherichia coli* ribosomal protein S1 is specifically involved in autogenous control. J. Bacteriol., 182(20):5872–5879 (2000).
- Boni IV, Artamonova VS, Tzareva NV und Dreyfus M. Non-canonical mechanism for translational control in bacteria: synthesis of ribosomal protein S1. *EMBO J*, 20(15):4222–4232 (2001).
- Borisova GP, Volkova TM, Berzin V, Rosenthal G und Gren EJ. The regulatory region of MS2 phage RNA replicase cistron. IV. Functional activity of specific MS2 RNA fragments in formation of the 70 S initiation complex of protein biosynthesis. *Nucl. Acids Res.*, 6(5):1761–1774 (1979).
- Bradford MM. 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 (1976).
- Brawerman G. Determinants of messenger RNA stability. Cell, 48(1):5-6 (1987).
- Brideau NJ, Flores HA, Wang J, Maheshwari S, Wang X und Barbash DA. Two Dobzhansky-Muller genes interact to cause hybrid lethality in *Drosophila*. *Science*, 314(5803):1292–1295 (2006).
- Brudno M, Steinkamp R und Morgenstern B. The CHAOS/DIALIGN WWW server for multiple alignment of genomic sequences. *Nucl. Acids Res.*, 32(Web Server Issue):W41–W44 (2004).
- Brutnell TP und Dellaporta SL. Somatic inactivation and reactivation of Ac associated with changes in cytosine methylation and transposase expression. Genetics, 138(1):213-225 (1994).
- Bräutigam K, Dietzel L und Pfannschmidt T. Cell and Molecular Biology of Plastids, Kap. Plastidnucleus communication: anterograde and retrograde signalling in the development and function of plastids, 409–455. Springer Berlin Heidelberg (2007).
- Burke JM und Arnold ML. Genetics and the fitness of hybrids. Annu. Rev. Genet., 35:31-52 (2001).
- Burland TG. DNASTAR's Lasergene sequence analysis software. Methods Mol Biol, 132:71–91 (2000).
- Börner T, Herrmann F und Hagemann R. Plastid ribosome deficient mutants of *Pelargonium zonale*. FEBS Lett., 37(2):117–119 (1973).
- Calogero RA, Pon CL, Canonaco MA und Gualerzi CO. Selection of the mRNA translation initiation region by *Escherichia coli* ribosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 85(17):6427–6431 (1988).
- Caserta E, Tomsic J, Spurio R, Teana AL, Pon CL und Gualerzi CO. Translation initiation factor IF2 interacts with the 30 S ribosomal subunit via two separate binding sites. J. Mol. Biol., 362(4):787–799 (2006).
- Chang B, Halgamuge S und Tang SL. Analysis of SD sequences in completed microbial genomes: Non-SD-led genes are as common as SD-led genes. *Gene*, 373:90–99 (2006).
- Chateigner-Boutin AL, Ramos-Vega M, Guevara-García A, Andrés C, de la Luz Gutiérrez-Nava M, Cantero A, Delannoy E, Jiménez LF, Lurin C, Small I, und León P. CLB19, a pentatricopeptide repeat protein required for editing of *rpoA* and *clpP* chloroplast transcripts. *The Plant Journal*, 56:590–602 (2008).
- Chen H, Bjerknes M, Kumar R und Jay E. Determination of the optimal aligned spacing between the Shine-Dalgarno sequence and the translation initiation codon of *Escherichia coli* mRNAs. *Nucl. Acids* Res., 22(23):4953–4957 (1994).
- Choquet Y und Wollman FA. Translational regulations as specific traits of chloroplast gene expression. *FEBS Lett.*, 529(1):39–42 (2002).
- Chumley TW, Palmer JD, Mower JP, Fourcade HM, Calie PJ, Boore JL und Jansen RK. The Complete Chloroplast Genome Sequence of *Pelargonium x hortorum*: Organization and Evolution of the Largest and Most Highly Rearranged Chloroplast Genome of Land Plants. *Mol. Biol. Evol.*, 23(11):2175–2190 (2006).

- Church GM und Gilbert W. Genomic Sequencing. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 81(7):1991–1995 (1984).
- Cleland R. Experimental Botany, Kap. Oenothera cytogenetics and evolution, 43–299. Academic Press, New York (1972).
- Danon A. Translational regulation in the chloroplast. Plant Physiol, 115(4):1293-1298 (1997).
- De Cosa B, Moar W, Lee SB, Miller M und Daniell H. Overexpression of the Bt cry2Aa2 operon in chloroplasts leads to formation of insecticidal crystals. Nat. Biotechnol., 19:71–74 (2001).
- de Smit MH und van Duin J. Translational initiation on structured messengers. Another role for the Shine-Dalgarno interaction. J. Mol. Biol., 235(1):173–184 (1994).
- de Smit MH und van Duin J. Translational standby sites: how ribosomes may deal with the rapid folding kinetics of mRNA. J. Mol. Biol., 331(4):737–743 (2003).
- de Smit MH, Verlaan PWG, van Duin J und Pleij CWA. Intracistronic transcriptional polarity enhances translational repression: a new role for *Rho. Mol. Microbiol.*, 69:1278–1289 (2008).
- Delp G und Kössel H. rRNAs and rRNA genes of plastids. The molecular biology of plastids, Cell culture and somatic cell genetics of plants, 7:139–167 (1991).
- Dobzhansky T. Studies on hybrid sterility. II. Localization of sterility factors in Drosophila pseudoobscura hybrids. *Genetics*, 21:113–135 (1936).
- Doyle JJ und Doyle JL. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19:11–15 (1987).
- Drager RG, Girard-Bascou J, Choquet Y, Kindle KL und Stern DB. In vivo evidence for 5'->3' exoribonuclease degradation of an unstable chloroplast mRNA. *Plant J*, 13(1):85-96 (1998).
- Dunn JJ, Buzash-Pollert E und Studier FW. Mutations of bacteriophage T7 that affect initiation of synthesis of the gene 0.3 protein. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 75(6):2741–2745 (1978).
- Eberhard S, Drapier D und Wollman FA. Searching limiting steps in the expression of chloroplast-encoded proteins: relations between gene copy number, transcription, transcript abundance and translation rate in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J*, 31(2):149–160 (2002).
- Eibl, Zou, Beck, Kim, Mullet und Koop. In vivo analysis of plastid *psbA*, *rbcL* and *rpl32* UTR elements by chloroplast transformation: tobacco plastid gene expression is controlled by modulation of transcript levels and translation efficiency. *Plant J*, 19(3):333–345 (1999).
- Esposito D, Hicks AJ und Stern DB. A role for initiation codon context in chloroplast translation. *Plant Cell*, 13(10):2373–2384 (2001).
- Fargo DC, Zhang M, Gillham NW und Boynton JE. Shine-Dalgarno-like sequences are not required for translation of chloroplast mRNAs in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts or in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet*, 257(3):271-282 (1998).
- Feierabend J und Schrader-Reichhardt U. Biochemical Differentiation of Plastids and Other Organelles in Rye Leaves with a High-Temperature-induced Deficiency of Plastid Ribosomes. *Planta*, 129:133–145 (1976).
- Felder S, Meierhoff K, Sane AP, Meurer J, Driemel C, Plücken H, Klaff P, Stein B, Bechtold N und Westhoff P. The nucleus-encoded *HCF107* gene of *Arabidopsis* provides a link between intercistronic RNA processing and the accumulation of translation-competent *psbH* transcripts in chloroplasts. *Plant Cell*, 13(9):2127–2141 (2001).
- Felsenstein J. PHYLIP Phylogeny Inference Package (Version 3.2). Cladistics, 5:164–166 (1989).
- Fiebig A, Stegemann S und Bock R. Rapid evolution of RNA editing sites in a small non-essential plastid gene. Nucl. Acids Res., 32(12):3615–3622 (2004).

- Franzetti B, Carol P und Mache R. Characterization and RNA-binding properties of a chloroplast S1-like ribosomal protein. J Biol Chem, 267(27):19075–19081 (1992).
- Freyer R, Hoch B, Neckermann K, Maier RM und Kössel H. RNA editing in maize chloroplasts is a processing step independent of splicing and cleavage to monocistronic mRNAs. *Plant J*, 4(4):621–629 (1993).
- Freyer R, Kiefer-Meyer MC und Kössel H. Occurrence of plastid RNA editing in all major lineages of land plants. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(12):6285-6290 (1997).
- Freyer R, López C, Maier RM, Martín M, Sabater B und Kössel H. Editing of the chloroplast ndhB encoded transcript shows divergence between closely related members of the grass family (Poaceae). *Plant Mol Biol*, 29(4):679–684 (1995).
- Gallie DR und Kado CI. A translational enhancer derived from tobacco mosaic virus is functionally equivalent to a Shine-Dalgarno sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 86(1):129–132 (1989).
- Gargano D, Vezzi A, Scotti N, Gray J, Valle G, Grillo S und Cardi T. The complete nucleotide sequence of potato (*Solanum tuberosum* cv. Desiree) chloroplast DNA. *abstracts 2nd solanaceae genome workshop*, 107 (2005).
- Giacco VD, Márquez V, Qin Y, Pech M, Triana-Alonso FJ, Wilson DN und Nierhaus KH. Shine-Dalgarno interaction prevents incorporation of noncognate amino acids at the codon following the AUG. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 105(31):10715-10720 (2008).
- Gold L. Posttranscriptional Regulatory Mechanisms in Escherichia Coli. Annu. Rev. Biochem., 57:199– 233 (1988).
- Gordon KHJ, Crouse EJ, Bohnert HJ und Herrmann RG. Physical mapping of differences in chloroplast DNA of the five wild-type plastomes in *Oenothera* subsection *Euoenothera*. *Theoretical and Applied Genetics*, 61:373-384 (1982).
- Goulding SE, Olmstead RG, Morden CW und Wolfe KH. Ebb and flow of the chloroplast inverted repeat. Mol Gen Genet, 252(1-2):195-206 (1996).
- Greiner S. *Oenothera*, a unique model to study the role of plastids in speciation. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München (2008).
- Greiner S, Wang X, Herrmann RG, Rauwolf U, Mayer K, Haberer G und Meurer J. The complete nucleotide sequences of the 5 genetically distinct plastid genomes of *Oenothera*, subsection *Oenothera*: II. A microevolutionary view using bioinformatics and formal genetic data. *Mol. Biol. Evol.*, 25(9):2019–2030 (2008a).
- Greiner S, Wang X, Rauwolf U, Silber MV, Mayer K, Meurer J, Haberer G und Herrmann RG. The complete nucleotide sequences of the five genetically distinct plastid genomes of *Oenothera*, subsection *Oenothera*: I. sequence evaluation and plastome evolution. *Nucl. Acids Res.*, 36(7):2366–2378 (2008b).
- Grieger P. Untersuchungen zur Züchtung variegater *Pelargonium x zonale*-Hybriden auf tetraploider Stufe. Dissertation, Humboldt-Universität (2007).
- Guhamajumdar M und Sears BB. Chloroplast DNA base substitutions: an experimental assessment. Mol. Genet. Genomics, 273(2):177–183 (2005).
- Guisinger MM, Kuehl JV, Boore JL und Jansen RK. Genome-wide analyses of *Geraniaceae* plastid DNA reveal unprecedented patterns of increased nucleotide substitutions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2008).
- Hachtel W, Neuss A und vom Stein J. A chloroplast DNA inversion marks an evolutionary split in the genus *Oenothera*. *Evolution*, 45(4):1050–1052 (1991).
- Hagemann R. Progress in Botany, vol. 63, Kap. Milestones in Plastid Genetics of Higher Plants, 1–51. Springer (2001).

- Hager M. Anwendung reverser Genetik zur Funktionsanalyse plastidenkodierter Gene. Dissertation, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i. Br. (2002).
- Hager M, Biehler K, Illerhaus J, Ruf S und Bock R. Targeted inactivation of the smallest plastid genomeencoded open reading frame reveals a novel and essential subunit of the cytochrome b(6)f complex. *EMBO J*, 18(21):5834–5842 (1999).
- Hager M und Bock R. Enslaved bacteria as new hope for plant biotechnologists. Appl. Microbiol. Biotechnol., 54(3):302-310 (2000).
- Hall MN, Gabay J, Débarbouillé M und Schwartz M. A role for mRNA secondary structure in the control of translation initiation. *Nature*, 295(5850):616–618 (1982).
- Harney PM und Chow TW. Crossability between some *Pelargonium* species. *Euphytica*, 20:286–291 (1971).
- Harte C. Monographs on Theoretical and Applied Genetics, Kap. Oenothera : contributions of a plant to biology. Springer (1994).
- Hartz D, McPheeters DS und Gold L. Selection of the initiator tRNA by *Escherichia coli* initiation factors. *Genes & Development*, 3(12A):1899–1912 (1989).
- Hashimoto M, Endo T, Peltier G, Tasaka M und Shikanai T. A nucleus-encoded factor, CRR2, is essential for the expression of chloroplast *ndhB* in Arabidopsis. *Plant J*, 36(4):541–549 (2003).
- Hedtke B, Legen J, Weihe A, Herrmann RG und Börner T. Six active phage-type RNA polymerase genes in *Nicotiana tabacum. Plant J*, 30(6):625–637 (2002).
- Herrmann RG, Maier RM und Schmitz-Linneweber C. Eukaryotic genome evolution: rearrangement and coevolution of compartmentalized genetic information. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 358(1429):87–97; discussion 97 (2003).
- Herschlag D. RNA chaperones and the RNA folding problem. J Biol Chem, 270(36):20871–20874 (1995).
- Hirose T, Ideue T, Wakasugi T und Sugiura M. The chloroplast infA gene with a functional UUG initiation codon. FEBS Lett., 445(1):169–172 (1999).
- Hirose T, Kusumegi T und Sugiura M. Translation of tobacco chloroplast rps14 mRNA depends on a Shine-Dalgarno-like sequence in the 5'-untranslated region but not on internal RNA editing in the coding region. FEBS Lett., 430(3):257–260 (1998).
- Hirose T und Sugiura M. Cis-acting elements and trans-acting factors for accurate translation of chloroplast psbA mRNAs: development of an in vitro translation system from tobacco chloroplasts. EMBO J, 15(7):1687–1695 (1996).
- Hirose T und Sugiura M. Both RNA editing and RNA cleavage are required for translation of tobacco chloroplast *ndhD* mRNA: a possible regulatory mechanism for the expression of a chloroplast operon consisting of functionally unrelated genes. *EMBO J*, 16(22):6804–6811 (1997).
- Hirose T und Sugiura M. Functional Shine-Dalgarno-like sequences for translational initiation of chloroplast mRNAs. Plant Cell Physiol., 45(1):114–117 (2004a).
- Hirose T und Sugiura M. Multiple elements required for translation of plastid *atpB* mRNA lacking the Shine-Dalgarno sequence. *Nucl. Acids Res.*, 32(11):3503–3510 (2004b).
- Hoch B, Maier RM, Appel K, Igloi GL und Kössel H. Editing of a chloroplast mRNA by creation of an initiation codon. *Nature*, 353(6340):178–180 (1991).
- Huang CY, Ayliffe MA und Timmis JN. Simple and complex nuclear loci created by newly transferred chloroplast DNA in tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 101(26):9710–9715 (2004).
- Hupfer H, Swiatek M, Hornung S, Herrmann RG, Maier RM, Chiu WL und Sears B. Complete nucleotide sequence of the *Oenothera elata* plastid chromosome and representing plastome I of the five distinguishable *euoenothera* plastomes. *Mol Gen Genet*, 263(4):581–585 (2000).

- Iost I und Dreyfus M. The stability of *Escherichia coli lacZ* mRNA depends upon the simultaneity of its synthesis and translation. *EMBO J*, 14(13):3252–3261 (1995).
- Jacob WF, Santer M und Dahlberg AE. A single base change in the Shine-Dalgarno region of 16S rRNA of Escherichia coli affects translation of many proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 84(14):4757-4761 (1987).
- James C, Gibby M und Barrett J. Molecular studies in *Pelargonium (Geraniaceae)*. A taxonomic appraisal of section *Ciconium* and the origin of the Zonal and Ivy-leaved cultivars. *Plant Systematics and Evolution*, 243(3):131–146 (2004).
- Jansen RK, Raubeson LA, Boore JL, dePamphilis CW, Chumley TW, Haberle RC, Wyman SK, Alverson AJ, Peery R, Herman SJ, Fourcade HM, Kuehl JV, McNeal JR, Leebens-Mack J und Cui L. Methods for obtaining and analyzing whole chloroplast genome sequences. *Methods Enzymol*, 395:348–384 (2005).
- Jenner L, Romby P, Rees B, Schulze-Briese C, Springer M, Ehresmann C, Ehresmann B, Moras D, Yusupova G und Yusupov M. Translational operator of mRNA on the ribosome: how repressor proteins exclude ribosome binding. *Science*, 308(5718):120–123 (2005).
- Jiang W, Chu SH, Piao R, Chin JH, Jin YM, Lee J, Qiao Y, Han L, Piao Z und Koh HJ. Fine mapping and candidate gene analysis of *hwh1* and *hwh2*, a set of complementary genes controlling hybrid breakdown in rice. *Theoretical and Applied Genetics*, 116:1117–1127 (2008).
- Jin H, Zhao Q, de Valdivia EIG, Ardell DH, Stenström M und Isaksson LA. Influences on gene expression in vivo by a Shine-Dalgarno sequence. *Mol. Microbiol.*, 60(2):480–492 (2006).
- Johnson. Speciation: Dobzhansky-Muller incompatibilities, dominance and gene interactions. Trends Ecol Evol, 15(12):480-482 (2000).
- Julián P, Konevega AL, Scheres SHW, Lázaro M, Gil D, Wintermeyer W, Rodnina MV und Valle M. Structure of ratcheted ribosomes with tRNAs in hybrid states. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 105(44):16924–16927 (2008).
- Kahlau S, Aspinall S, Gray JC und Bock R. Sequence of the tomato chloroplast DNA and evolutionary comparison of *solanaceous* plastid genomes. J. Mol. Evol., 63(2):194–207 (2006).
- Kahlau S und Bock R. Plastid transcriptomics and translatomics of tomato fruit development and chloroplast-to-chromoplast differentiation: chromoplast gene expression largely serves the production of a single protein. *Plant Cell*, 20(4):856–874 (2008).
- Kaminishi T, Wilson DN, Takemoto C, Harms JM, Kawazoe M, Schluenzen F, Hanawa-Suetsugu K, Shirouzu M, Fucini P und Yokoyama S. A Snapshot of the 30S Ribosomal Subunit Capturing mRNA via the Shine-Dalgarno Interaction. *Structure*, 15(3):289–297 (2007).
- Kaneko T, Sato S, Kotani H, Tanaka A, Asamizu E, Nakamura Y, Miyajima N, Hirosawa M, Sugiura M, Sasamoto S, Kimura T, Hosouchi T, Matsuno A, Muraki A, Nakazaki N, Naruo K, Okumura S, Shimpo S, Takeuchi C, Wada T, Watanabe A, Yamada M, Yasuda M und Tabata S. Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *DNA Res.*, 3(3):109–136 (1996).
- Kapust RB, Tözsér J, Copeland TD und Waugh DS. The P1' specificity of tobacco etch virus protease. Biochem. Biophys. Res. Commun., 294:949–955 (2002).
- Karcher D, Kahlau S und Bock R. Faithful editing of a tomato-specific mRNA editing site in transgenic tobacco chloroplasts. *RNA*, 14(2):217–224 (2008).
- Katayama H und Ogihara Y. Phylogenetic affinities of the grasses to other monocots as revealed by molecular analysis of chloroplast DNA. *Curr. Genet.*, 29(6):572–581 (1996).
- Khakhlova O und Bock R. Elimination of deleterious mutations in plastid genomes by gene conversion. Plant J, 46(1):85–94 (2006).

- Kim J und Mullet JE. Ribosome-binding sites on chloroplast *rbcL* and *psbA* mRNAs and light-induced initiation of D1 translation. *Plant Mol Biol*, 25(3):437-448 (1994).
- Kim M, Christopher DA und Mullet JE. Direct evidence for selective modulation of *psbA*, *rpoA*, *rbcL* and *16S* RNA stability during barley chloroplast development. *Plant Mol Biol*, 22(3):447–463 (1993).
- Kimura S, Umemura T und Iyanagi T. Two-cistronic expression plasmids for high-level gene expression in *Escherichia coli* preventing translational initiation inhibition caused by the intramolecular local secondary structure of mRNA. *J Biochem*, 137(4):523–533 (2005).
- Klinkert B, Elles I und Nickelsen J. Translation of chloroplast *psbD* mRNA in *Chlamydomonas* is controlled by a secondary RNA structure blocking the AUG start codon. *Nucl. Acids Res.*, 34(1):386–394 (2006).
- Kode V, Mudd EA, Iamtham S und Day A. The tobacco plastid accD gene is essential and is required for leaf development. *Plant J*, 44(2):237–244 (2005).
- Komarova AV, Tchufistova LS, Supina EV und Boni IV. Protein S1 counteracts the inhibitory effect of the extended Shine-Dalgarno sequence on translation. *RNA*, 8(9):1137–1147 (2002).
- Konishi T, Shinohara K, Yamada K und Sasaki Y. Acetyl-CoA carboxylase in higher plants: most plants other than gramineae have both the prokaryotic and the eukaryotic forms of this enzyme. *Plant Cell Physiol.*, 37(2):117–122 (1996).
- Koo JS und Spremulli LL. Analysis of the translational initiation region on the Euglena gracilis chloroplast ribulose-bisphosphate carboxylase/oxygenase (*rbcL*) messenger RNA. J Biol Chem, 269(10):7494–7500 (1994).
- Kotera E, Tasaka M und Shikanai T. A pentatricopeptide repeat protein is essential for RNA editing in chloroplasts. *Nature*, 433(7023):326–330 (2005).
- Kozak M. Comparison of initiation of protein synthesis in procaryotes, eucaryotes, and organelles. Microbiol Rev, 47(1):1–45 (1983).
- Kozak M. Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes. Gene, 234(2):187–208 (1999).
- Kozak M. Regulation of translation via mRNA structure in prokaryotes and eukaryotes. *Gene*, 361:13–37 (2005).
- Kudla J, Igloi GL, Metzlaff M, Hagemann R und Kössel H. RNA editing in tobacco chloroplasts leads to the formation of a translatable psbL mRNA by a C to U substitution within the initiation codon. EMBO J, 11(3):1099–1103 (1992).
- Kuroda H und Maliga P. Complementarity of the 16S rRNA penultimate stem with sequences downstream of the AUG destabilizes the plastid mRNAs. *Nucl. Acids Res.*, 29(4):970–975 (2001).
- Kuroda H, Suzuki H, Kusumegi T, Hirose T, Yukawa Y und Sugiura M. Translation of *psbC* mRNAs starts from the downstream GUG and not the upstream AUG and and requires the extended Shine-Dalgarno sequence in tobacco chloroplasts. *Plant Cell Physiol.*, 48(9):1374–1378 (2007).
- Kushnir S, Babiychuk E, Bannikova M, Momot V, Komarnitsky I, Cherep N und Gleba Y. Nucleocytoplasmic incompatibility in cybrid plants possessing an Atropa genome and a Nicotiana plastome. Mol Gen Genet, 225(2):225–230 (1991).
- Kushnir SG, Shlumukov LR, Pogrebnyak NJ, Berger S und Gleba Y. Functional cybrid plants possessing a *Nicotiana* genome and an *Atropa* plastome. *Mol Gen Genet*, 209(1):159–163 (1987).
- Laemmli UK. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227:680–685 (1970).
- Landry CR, Hartl DL und Ranz JM. Genome clashes in hybrids: insights from gene expression. *Heredity*, 99(5):483–493 (2007).

- Larkin M, Blackshields G, Brown N, Chenna R, McGettigan P, McWilliam H, Valentin F, Wallace I, Wilm A, Lopez R, Thompson J, Gibson T und Higgins D. ClustalW and ClustalX version 2. *Bioinformatics*, 23:2947–2948 (2007).
- Laursen BS, Sørensen HP, Mortensen KK und Sperling-Petersen HU. Initiation of protein synthesis in bacteria. Microbiol Mol Biol Rev, 69(1):101-123 (2005).
- Lee K, Holland-Staley CA und Cunningham PR. Genetic analysis of the Shine-Dalgarno interaction: selection of alternative functional mRNA-rRNA combinations. RNA, 2(12):1270–1285 (1996).
- Lemaire SD, Guillon B, Maréchal PL, Keryer E, Miginiac-Maslow M und Decottignies P. New thioredoxin targets in the unicellular photosynthetic eukaryote *Chlamydomonas reinhardtii*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 101(19):7475-7480 (2004).
- Lindenhahn MM, Metzlaff M und Hagemann R. Remarkable restriction pattern differences between green and white branches of variegated "plastome mutator"plants of *Oenothera hookeri*. Molecular and General Genetics MGG, 200:503–505 (1985).
- Lohse M, Drechsel O und Bock R. OrganellarGenomeDRAW (OGDRAW): a tool for the easy generation of high-quality custom graphical maps of plastid and mitochondrial genomes. *Curr. Genet.*, 52:267–274 (2007).
- Ludeman JP, Pike RN, Bromfield KM, Duggan PJ, Cianci J, Bonniec BL, Whisstock JC und Bottomley SP. Determination of the P'1, P'2, P'3 subsite-specificity of factor Xa. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 35:221-225 (2003).
- Ma J, Campbell A und Karlin S. Correlations between Shine-Dalgarno Sequences and Gene Features Such as Predicted Expression Levels and Operon Structures. J. Bacteriol., 184:5733–5745 (2002).
- Maier RM, Hoch B, Zeltz P und Kössel H. Internal editing of the maize chloroplast ndhA transcript restores codons for conserved amino acids. *Plant Cell*, 4(5):609–616 (1992).
- Maier RM, Neckermann K, Igloi GL und Kössel H. Complete sequence of the maize chloroplast genome: gene content, hotspots of divergence and fine tuning of genetic information by transcript editing. J Mol Biol, 251(5):614–628 (1995).
- Maliga P. Two plastid RNA polymerases of higher plants: an evolving story. *Trends Plant Sci.*, 1:4–6 (1998).
- Manuell A, Beligni MV, Yamaguchi K und Mayfield SP. Regulation of chloroplast translation: interactions of RNA elements and RNA-binding proteins and the plastid ribosome. *Biochem. Soc. Trans.*, 32(Pt 4):601-605 (2004).
- Manuell AL, Quispe J und Mayfield SP. Structure of the chloroplast ribosome: novel domains for translation regulation. *PLoS Biol.*, 5(8):e209 (2007).
- Marin-Navarro J, Manuell A, Wu J und Mayfield S. Chloroplast translation regulation. *Photosynth. Res.*, 94:359–374 (2007).
- Marshall RA, Dorywalska M und Puglisi JD. Irreversible chemical steps control intersubunit dynamics during translation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 105:15364–15369 (2008).
- Martin W und Herrmann R. Gene Transfer from Organelles to the Nucleus: How Much, What Happens, and Why? *Plant Physiol*, 118:9–17 (1998).
- Martin W, Rujan T, Richly E, Hansen A, Cornelsen S, Lins T, Leister D, Stoebe B, Hasegawa M und Penny D. Evolutionary analysis of *Arabidopsis*, cyanobacterial, and chloroplast genomes reveals plastid phylogeny and thousands of cyanobacterial genes in the nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* A., 99(19):12246–12251 (2002).
- Marzi S, Myasnikov AG, Serganov A, Ehresmann C, Romby P, Yusupov M und Klaholz BP. Structured mRNAs Regulate Translation Initiation by Binding to the Platform of the Ribosome. *Cell*, 130(6):1019–1031 (2007).

- Mathews D, Sabina J, Zuker M und Turner D. Expanded Sequence Dependence of Thermodynamic Parameters Improves Prediction of RNA Secondary Structure. J. Mol. Biol., 288:911-940 (1999).
- Matsubara K, Ando T, Mizubayashi T, Ito S und Yano M. Identification and linkage mapping of complementary recessive genes causing hybrid breakdown in an intraspecific rice cross. *Theor Appl Genet*, 115(2):179–186 (2007).
- Mayfield SP, Cohen A, Danon A und Yohn CB. Translation of the *psbA* mRNA of *Chlamydomonas* reinhardtii requires a structured RNA element contained within the 5' untranslated region. J. Cell Biol., 127(6 Pt 1):1537-1545 (1994).
- McCarthy J und Gualerzia C. Translational control of prokaryotic gene expression. *Trends Genet.*, 6:78–85 (1990).
- McInerney P, Mizutani T und Shiba T. Inorganic polyphosphate interacts with ribosomes and promotes translation fidelity *in vitro* and *in vivo*. *Mol. Microbiol.*, 60(2):438–447 (2006).
- Meierhoff K, Felder S, Nakamura T, Bechtold N und Schuster G. HCF152, an *Arabidopsis* RNA binding pentatricopeptide repeat protein involved in the processing of chloroplast *psbB-psbT-psbH-petB-petD* RNAs. *Plant Cell*, 15(6):1480–1495 (2003).
- Melançon P, Leclerc D, Destroismaisons N und Brakier-Gingras L. The anti-Shine-Dalgarno region in Escherichia coli 16S ribosomal RNA is not essential for the correct selection of translational starts. Biochemistry, 29(13):3402-3407 (1990).
- Meng BY, Tanaka M, Wakasugi T, Ohme M, Shinozaki K und Sugiura M. Cotranscription of the genes encoding two P700 chlorophyll a apoproteins with the gene for ribosomal protein CS14: determination of the transcriptional initiation site by in vitro capping. *Curr. Genet.*, 14(4):395–400 (1988).
- Merendino L, Falciatore A und Rochaix JD. Expression and RNA binding properties of the chloroplast ribosomal protein S1 from Chlamydomonas reinhardtii. *Plant Mol Biol*, 53(3):371–382 (2003).
- Mereschkowsky C. Über Natur und Ursprung der Chromatophoren im Pflanzenreiche. Biologisches Centralblatt, 25(18):593-604 (1905).
- Metzlaff M. Molekulargenetische Analyse des Plastoms der Gattung *Pelargonium*. Masterarbeit, Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg (1980).
- Metzlaff M. Molekulare Klonierung und Charakterisierung der plastidalen ribosomalen DNA von *Pelargonium zonale* (L.). Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg (1983).
- Metzlaff M, Börner T und Hagemann R. Variations of chloroplast DNAs in the genus *Pelargonium* and their biparental inheritance. *Theoretical and Applied Genetics*, 60:37–41 (1981).
- Metzlaff M, Pohlheim F, Börner T und Hagemann R. Hybrid variegation in the genus *Pelargonium*. *Curr. Genet.*, 5:245–249 (1982).
- Moll I, Huber M, Grill S, Sairafi P, Mueller F, Brimacombe R, Londei P und Bläsi U. Evidence against an Interaction between the mRNA downstream box and 16S rRNA in translation initiation. J. Bacteriol., 183(11):3499–3505 (2001).
- Muller H und Pontecorvo G. Recombinants between *Drosophila* species the F1 hybrids of which are sterile. *Nature*, 146:199–200 (1940).
- Mülhardt C. Der Experimentator: Molekularbiologie. Spektrum Akademischer Verlag, 2 ed. (2000).
- Nakamoto T. A unified view of the initiation of protein synthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 341(3):675–678 (2006).
- Neckermann K, Zeltz P, Igloi GL, Kössel H und Maier RM. The role of RNA editing in conservation of start codons in chloroplast genomes. *Gene*, 146(2):177–182 (1994).

- Neuhaus HE und Emes MJ. nonphotosynthetic metabolism in plastids. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 51:111-140 (2000).
- Neupert J, Karcher D und Bock R. Design of simple synthetic RNA thermometers for temperaturecontrolled gene expression in Escherichia coli. *Nucl. Acids Res.* (2008).
- Newbury SF, Smith NH und Higgins CF. Differential mRNA stability controls relative gene expression within a polycistronic operon. *Cell*, 51(6):1131–1143 (1987).
- Nickelsen J, nad Eric Boudreau MF, Rahire M, und Rochaix JD. Identification of cis-Acting RNA Leader Elements Required for Chloroplast psbD Gene Expression in Chlamydomonas. *Plant Cell*, 11:957–970 (1999).
- O'Connor M, Asai T, Squires CL und Dahlberg AE. Enhancement of translation by the downstream box does not involve base pairing of mRNA with the penultimate stem sequence of 16S rRNA. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 96(16):8973–8978 (1999).
- Palmer J, Osorio B, Aldrich J und Thompson W. Chloroplast DNA evolution among legumes: Loss of a large inverted repeat occurred prior to other sequence rearrangements. *Curr. Genet.*, 11(4):275–286 (1987).
- Palmer J, Osorio B und Thompson W. Evolutionary significance of inversions in legume chloroplast DNAs. Curr. Genet., 14(1):65-74 (1988).
- Park YS, Seo SW, Hwang S, Chu HS, Ahn JH, Kim TW, Kim DM und Jung GY. Design of 5'untranslated region variants for tunable expression in *Escherichia coli. Biochem. Biophys. Res. Com*mun., 356(1):136-141 (2007).
- Peled-Zehavi H und Danon A. Cell and Molecular Biology of Plastids, Kap. Translation and translational regulation in chloroplasts, 249–281. Springer Berlin Heidelberg (2007).
- Pesaresi P, Varotto C, Meurer J, Jahns P, Salamini F und Leister D. Knock-out of the plastid ribosomal protein L11 in *Arabidopsis*: effects on mRNA translation and photosynthesis. *Plant J*, 27(3):179–189 (2001).
- Plader W und Sugiura M. The Shine-Dalgarno-like sequence is a negative regulatory element for translation of tobacco chloroplast *rps2* mRNA: an additional mechanism for translational control in chloroplasts. *Plant J*, 34(3):377–382 (2003).
- Pohlheim F. Hybrid Variegation in Crosses between Pelargonium zonale (L.) l'Herit. ex Ait. and Pelargonium inquinans (L.) l'Herit. ex Ait. Plant Breeding, 97:93–96 (1986).
- Qing G, Xia B und Inouye M. Enhancement of translation initiation by A/T-rich sequences downstream of the initiation codon in *Escherichia coli*. J. Mol. Microbiol. Biotechnol., 6(3-4):133-144 (2003).
- Rasmussen LCV, Oliveira CLP, Jensen JM, Pedersen JS, Sperling-Petersen HU und Mortensen KK. Solution structure of C-terminal *Escherichia coli* translation initiation factor IF2 by small-angle X-ray scattering. *Biochemistry*, 47(20):5590–5598 (2008).
- Raubeson L und Jansen R. Plant Diversity and Evolution: Genotypic and Phenotypic Variation in Higher Plants, Kap. Chloroplast genomes of plants, 45–68. CABI (2005).
- Raynaud C, Loiselay C, Wostrikoff K, Kuras R, Girard-Bascou J, Wollman FA und Choquet Y. Evidence for regulatory function of nucleus-encoded factors on mRNA stabilization and translation in the chloroplast. Proc Natl Acad Sci U S A, 104(21):9093–9098 (2007).
- Reinbothe S, Reinbothe C, Heintzen C, Seidenbecher C und Parthier B. A methyl jasmonate-induced shift in the length of the 5' untranslated region impairs translation of the plastid *rbcL* transcript in barley. *EMBO J*, 12(4):1505–1512 (1993).
- Renner O. Vererbung bei Artbastarden. Zeitschrift für induktive Abstammungs- und Vererbungslehre, 33:317-347 (1924).

- Renner O. Zur Genetik und Cytologie der Oenothera chicaginensis und ihrer Abkömmlinge. Molecular and General Genetics MGG, 66:275–318 (1934).
- Renner O. Zur Kenntnis der nichtmendelnden Buntheit der Laubblätter. Flora, 30:218–290 (1936).
- Richly E und Leister D. An improved prediction of chloroplast proteins reveals diversities and commonalities in the chloroplast proteomes of Arabidopsis and rice. *Gene*, 329:11–16 (2004).
- Ringquist S, Shinedling S, Barrick D, Green L, Binkley J, Stormo GD und Gold L. Translation initiation in *Escherichia coli*: sequences within the ribosome-binding site. *Mol. Microbiol.*, 6(9):1219–1229 (1992).
- Rinke-Appel J, Jünke N, Brimacombe R, Lavrik I, Dokudovskaya S, Dontsova O und Bogdanov A. Contacts between 16S ribosomal RNA and mRNA, within the spacer region separating the AUG initiator codon and the Shine-Dalgarno sequence; a site-directed cross-linking study. Nucl. Acids Res., 22(15):3018-3025 (1994).
- Rochaix JD, Perron K, Dauvillée D, Laroche F, Takahashi Y und Goldschmidt-Clermont M. Posttranscriptional steps involved in the assembly of photosystem I in *Chlamydomonas. Biochem. Soc. Trans.*, 32(Pt 4):567–570 (2004).
- Rogalski M. Translation in plastids: Elucidation of decoding mechanisms and functions of ribosomal components. Dissertation, Universität Potsdam (2008).
- Rogalski M, Karcher D und Bock R. Superwobbling facilitates translation with reduced tRNA sets. Nature Structural & Molecular Biology, 15(2):192–198 (2008).
- Rogalski M, Ruf S und Bock R. Tobacco plastid ribosomal protein S18 is essential for cell survival. *Nucl.* Acids Res., 34(16):4537-4545 (2006).
- Ruf M und Kössel H. Occurrence and spacing of ribosome recognition sites in mRNAs of chloroplasts from higher plants. *FEBS Lett.*, 240:41–44 (1988).
- Ruf S, Hermann M, Berger IJ, Carrer H und Bock R. Stable genetic transformation of tomato plastids and expression of a foreign protein in fruit. *Nat. Biotechnol.*, 19(9):870–875 (2001).
- Ruf S, Karcher D und Bock R. Determining the transgene containment level provided by chloroplast transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 104(17):6998-7002 (2007).
- Ruf S, Kössel H und Bock R. Targeted inactivation of a tobacco intron-containing open reading frame reveals a novel chloroplast-encoded photosystem I-related gene. J. Cell Biol., 139(1):95–102 (1997).
- Sacerdot C, Chiaruttini C, Engst K, Graffe M, Milet M, Mathy N, Dondon J und Springer M. The role of the AUU initiation codon in the negative feedback regulation of the gene for translation initiation factor IF3 in *Escherichia coli. Mol. Microbiol.*, 21(2):331–346 (1996).
- Sakamoto W, Chen X, Kindle KL und Stern DB. Function of the *Chlamydomonas reinhardtii petD* 5' untranslated region in regulating the accumulation of subunit IV of the cytochrome b6/f complex. *Plant J*, 6(4):503-512 (1994).
- Sambrook J und Russell D. Molecular cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory (2001).
- Santis-MacIossek GD, Kofer W, Bock A, Schoch S, Maier RM, Wanner G, Rüdiger W, Koop HU und Herrmann RG. Targeted disruption of the plastid RNA polymerase genes rpoA and B and C1: molecular biology and biochemistry and ultrastructure. *Plant J*, 18(5):477–489 (1999).
- Sasaki T, Yukawa Y, Miyamoto T, Obokata J und Sugiura M. Identification of RNA editing sites in chloroplast transcripts from the maternal and paternal progenitors of tobacco (Nicotiana tabacum): comparative analysis shows the involvement of distinct trans-factors for ndhB editing. *Mol. Biol. Evol.*, 20(7):1028–1035 (2003).
- Sasaki Y, Konishi T und Nagano Y. The Compartmentation of Acetyl-Coenzyme A Carboxylase in Plants. *Plant Physiol*, 108(2):445-449 (1995).

- Sasaki Y, Kozaki A, Ohmori A, Iguchi H und Nagano Y. Chloroplast RNA editing required for functional acetyl-CoA carboxylase in plants. *J Biol Chem*, 276(6):3937–3940 (2001).
- Satina S und Blakeslee AF. Periclinal Chimeras in *Datura stramonium* in Relation to Development of Leaf and Flower. *American Journal of Botany*, 28(10):862-871 (1941).
- Schaegger H und von Jagow G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.*, 166(2):368–379 (1987).
- Schlax PJ und Worhunsky DJ. Translational repression mechanisms in prokaryotes. *Mol. Microbiol.*, 48(5):1157–1169 (2003).
- Schlax PJ, Xavier KA, Gluick TC und Draper DE. Translational repression of the Escherichia coli alpha operon mRNA: importance of an mRNA conformational switch and a ternary entrapment complex. J Biol Chem, 276(42):38494-38501 (2001).
- Schmitz UK und Kowallik KV. Plastid inheritance in Epilobium. Curr. Genet., 11:1-5 (1986).
- Schmitz-Linneweber C und Barkan A. Cell and Molecular Biology of Plastids, Kap. RNA splicing and RNA editing in chloroplasts, 213–248. Springer Berlin / Heidelberg (2007).
- Schmitz-Linneweber C, Kushnir S, Babiychuk E, Poltnigg P, Herrmann RG und Maier RM. Pigment deficiency in nightshade/tobacco cybrids is caused by the failure to edit the plastid ATPase alphasubunit mRNA. *Plant Cell*, 17(6):1815–1828 (2005a).
- Schmitz-Linneweber C, Regel R, Du TG, Hupfer H, Herrmann RG und Maier RM. The plastid chromosome of *Atropa belladonna* and its comparison with that of Nicotiana tabacum: the role of RNA editing in generating divergence in the process of plant speciation. *Mol. Biol. Evol.*, 19(9):1602–1612 (2002).
- Schmitz-Linneweber C, Williams-Carrier R und Barkan A. RNA immunoprecipitation and microarray analysis show a chloroplast Pentatricopeptide repeat protein to be associated with the 5' region of mRNAs whose translation it activates. *Plant Cell*, 17(10):2791–2804 (2005b).
- Schneider TD und Stephens RM. Sequence logos: a new way to display consensus sequences. Nucl. Acids Res., 18(20):6097–6100 (1990).
- Schötz F. Periodische Ausbleichungserscheinungen des Laubes bei Oenothera. Planta, 52:351-392 (1958).
- Serino G und Maliga P. RNA polymerase subunits encoded by the plastid *rpo* genes are not shared with the nucleus-encoded plastid enzyme. *Plant Physiol*, 117(4):1165–1170 (1998).
- Sharma MR, Wilson DN, Datta PP, Barat C, Schluenzen F, Fucini P und Agrawal RK. Cryo-EM study of the spinach chloroplast ribosome reveals the structural and functional roles of plastid-specific ribosomal proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 104(49):19315–19320 (2007).
- Shih YP, Wu HC, Hu SM, Wang TF und Wang AHJ. Self-cleavage of fusion protein in vivo using TEV protease to yield native protein. *Protein Sci.*, 14(4):936–941 (2005).
- Shikanai T. RNA editing in plant organelles: machinery, physiological function and evolution. *Cell. Mol. Life Sci.*, 63(6):698–708 (2006).
- Shine J und Dalgarno L. The 3'-Terminal Sequence of Escherichia coli 16S Ribosomal RNA: Complementarity to Nonsense Triplets and Ribosome Binding Sites. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 71:1342–1346 (1974).
- Shinozaki K, Ohme M, Tanaka M, Wakasugi T, Hayashida N, Matsubayashi T, Zaita N, Chunwongse J, Obokata J, Yamaguchi-Shinozaki K, Ohto C, Torazawa K, Meng BY, Sugita M, Deno H, Kamogashira T, Yamada K, Kusuda J, Takaiwa F, Kato A, Tohdoh N, Shimada H und Sugiura M. The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome: its gene organization and expression. *EMBO J*, 5(9):2043–2049 (1986).

- Shultzaberger RK, Bucheimer RE, Rudd KE und Schneider TD. Anatomy of *Escherichia coli* ribosome binding sites. J. Mol. Biol., 313(1):215–228 (2001).
- Simonetti A, Marzi S, Myasnikov AG, Fabbretti A, Yusupov M, Gualerzi CO und Klaholz BP. Structure of the 30S translation initiation complex. *Nature*, 455:416–420 (2008).
- Skorski P, Leroy P, Fayet O, Dreyfus M und Denmat SHL. The highly efficient translation initiation region from the *Escherichia coli rpsA* gene lacks a Shine-Dalgarno element. J. Bacteriol., 188(17):6277–6285 (2006).
- Spanjaard RA und van Duin J. Translational reinitiation in the presence and absence of a Shine and Dalgarno sequence. *Nucl. Acids Res.*, 17(14):5501-5507 (1989).
- Sprengart ML, Fuchs E und Porter AG. The downstream box: an efficient and independent translation initiation signal in *Escherichia coli. EMBO J*, 15(3):665-674 (1996).
- Starmer J, Stomp A, Vouk M und Bitzer D. Predicting Shine-Dalgarno sequence locations exposes genome annotation errors. *PLoS Comput. Biol.*, 2(5):e57 (2006).
- Stegemann S und Bock R. Experimental reconstruction of functional gene transfer from the tobacco plastid genome to the nucleus. *Plant Cell*, 18(11):2869–2878 (2006).
- Stegemann S, Hartmann S, Ruf S und Bock R. High-frequency gene transfer from the chloroplast genome to the nucleus. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 100(15):8828-8833 (2003).
- Steitz JA. Polypeptide chain initiation: nucleotide sequences of the three ribosomal binding sites in bacteriophage R17 RNA. Nature, 224(5223):957-964 (1969).
- Stern MJ, Ames GF, Smith NH, Robinson EC und Higgins CF. Repetitive extragenic palindromic sequences: a major component of the bacterial genome. *Cell*, 37(3):1015–1026 (1984).
- Stubbe W. Genetische Analyse des Zusammenwirkens von Genom und Plastom bei Oenothera. Z Verebungslehre/Molecular and General Genetics MGG, 90:288–298 (1959).
- Stubbe W. Oenothera An ideal system for studying the interactions of genome and plastome. Plant Molecular Biology Reporter, 7(4):245-257 (1989).
- Stubbe W und Raven PH. A genetic contribution to the taxonomy of Oenothera sect. Oenothera (including subsections Eucenothera, Emersonia, Raimannia and Munzia). Plant Systematics and Evolution, 133:39–59 (1979).
- Studer SM und Joseph S. Unfolding of mRNA secondary structure by the bacterial translation initiation complex. Mol. Cell, 22(1):105–115 (2006).
- Sugiura C, Kobayashi Y, Aoki S, Sugita C und Sugita M. Complete chloroplast DNA sequence of the moss *Physcomitrella patens*: evidence for the loss and relocation of *rpoA* from the chloroplast to the nucleus. *Nucl. Acids Res.*, 31(18):5324–5331 (2003).
- Sugiura M, Hirose T und Sugita M. Evolution and mechanism of translation in chloroplasts. Annu. Rev. Genet., 32:437-459 (1998).
- Sun Q, Emanuelsson O und van Wijk KJ. Analysis of curated and predicted plastid subproteomes of Arabidopsis. Subcellular compartmentalization leads to distinctive proteome properties. *Plant Physiol*, 135(2):723-734 (2004).
- Svab Z, Hajdukiewicz P und Maliga P. Stable transformation of plastids in higher plants. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 87(21):8526-8530 (1990).
- Svab Z und Maliga P. High-frequency plastid transformation in tobacco by selection for a chimeric aadA gene. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 90(3):913-917 (1993).
- Tatusova T und Madden T. Blast 2 sequences a new tool for comparing protein and nucleotide sequences. FEMS Microbiol. Lett., 174:247–250 (1999).

Tilney-Bassett RAE. The structure of periclinal chimeras. *Heredity*, 18:265–285 (1963).

- Tilney-Bassett RAE. The control of plastid inheritance in Pelargonium. IV. Heredity, 37:95–107 (1976).
- Tilney-Bassett RAE und Almouslem AB. Variation in plastid inheritance between *Pelargonium* cultivars and their hybrids. *Heredity*, 63:145–153 (1989).
- Towbin H, Staehelin T und Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 76(9):4350–4354 (1979).
- Tözsér J, Tropea JE, Cherry S, Bagossi P, Copeland TD, Wlodawer A und Waugh DS. Comparison of the substrate specificity of two potyvirus proteases. *FEBS J.*, 272:514–523 (2005).
- Uemura S, Dorywalska M, Lee TH, Kim HD, Puglisi JD und Chu S. Peptide bond formation destabilizes Shine-Dalgarno interaction on the ribosome. *Nature*, 446(7134):454–457 (2007).
- Ureshino K, Miyajima I, Ozaki Y, Kobayashi N, Michishita A und Akabane M. Appearance of albino seedlings and ptDNA inheritance in interspecific hybrids of *azalea*. *Euphytica*, 110:61–66 (1999).
- van den Berg S, Löfdahl PA, Härd T und Berglund H. Improved solubility of TEV protease by directed evolution. J. Biotechnol., 121(3):291–298 (2006).
- Varshavsky A. The N-end rule: functions and mysteries and uses. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 93(22):12142-12149 (1996).
- Vellanoweth RL und Rabinowitz JC. The influence of ribosome-binding-site elements on translational efficiency in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli in vivo*. Mol. Microbiol., 6(9):1105–1114 (1992).
- Vera A und Sugiura M. Chloroplast rRNA transcription from structurally different tandem promoters: an additional novel-type promoter. *Curr. Genet.*, 27(3):280–284 (1995).
- Verwoerd T, Dekker B und Hoekema A. A small-scale procedure for the rapid isolation of plant RNAs. Nucl. Acids Res., 17:2362 (1989).
- Vimberg V, Tats A, Remm M und Tenson T. Translation initiation region sequence preferences in Escherichia coli. BMC Mol Biol, 8:100 (2007).
- Wagner LA, Gesteland RF, Dayhuff TJ und Weiss RB. An efficient Shine-Dalgarno sequence but not translation is necessary for *lacZ* mRNA stability in *Escherichia coli*. J. Bacteriol., 176(6):1683–1688 (1994).
- Wang J, Tian L, Lee H, Wei N, Jiang H, Watson B, Madlung A, Osborn T, Doerge R, Comai L et al. Genomewide Nonadditive Gene Regulation in Arabidopsis Allotetraploids. Genetics, 172(1):507–517 (2006).
- Wen JD, Lancaster L, Hodges C, Zeri AC, Yoshimura SH, Noller HF, Bustamante C und Tinoco I. Following translation by single ribosomes one codon at a time. *Nature*, 452(7187):598-603 (2008).
- Westhoff P und Herrmann RG. Complex RNA maturation in chloroplasts. The *psbB* operon from spinach. *Eur J Biochem*, 171(3):551–564 (1988).
- Wintermeyer W und Gualerzi C. Effect of *Escherichia coli* initiation factors on the kinetics of N-Acphe-tRNAPhe binding to 30S ribosomal subunits. A fluorescence stopped-flow study. *Biochemistry*, 22(3):690–694 (1983).
- Wintz H und Hanson MR. A termination codon is created by RNA editing in the petunia atp9 transcript. Curr Genet, 19(1):61-64 (1991).
- Wolfe KH, Morden CW und Palmer JD. Function and evolution of a minimal plastid genome from a nonphotosynthetic parasitic plant. Proc Natl Acad Sci U S A, 89(22):10648-10652 (1992).

- Yamaguchi K, Prieto S, Beligni MV, Haynes PA, McDonald WH, Yates JR und Mayfield SP. Proteomic characterization of the small subunit of *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast ribosome: identification of a novel S1 domain-containing protein and unusually large orthologs of bacterial S2, S3, and S5. *Plant Cell*, 14(11):2957–2974 (2002).
- Yamaguchi K und Subramanian AR. The plastid ribosomal proteins. Identification of all the proteins in the 50 S subunit of an organelle ribosome (chloroplast). J Biol Chem, 275(37):28466-28482 (2000).
- Yamaguchi K und Subramanian AR. Proteomic identification of all plastid-specific ribosomal proteins in higher plant chloroplast 30S ribosomal subunit. Eur J Biochem, 270(2):190–205 (2003).
- Yamaguchi K, von Knoblauch K und Subramanian AR. The plastid ribosomal proteins. Identification of all the proteins in the 30 S subunit of an organelle ribosome (chloroplast). *J Biol Chem*, 275(37):28455–28465 (2000).
- Yamamoto E, Takashi T, Morinaka Y, Lin S, Kitano H, Matsuoka M und Ashikari M. Interaction of two recessive genes, hbd2 and hbd3, induces hybrid breakdown in rice. *Theor Appl Genet*, 115(2):187–194 (2007).
- Yao JL, Cohen D und Rowland RE. Plastid DNA inheritance and plastome-genome incompatibility in interspecific hybrids of Zantedeschia (Araceae). *Theoretical and Applied Genetics*, 88:255–260 (1994).
- Ye GN, Hajdukiewicz PT, Broyles D, Rodriguez D, Xu CW, Nehra N und Staub JM. Plastid-expressed 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase genes provide high level glyphosate tolerance in tobacco. *Plant J*, 25(3):261–270 (2001).
- Yoo JH und RajBhandary UL. Requirements for translation re-initiation in *Escherichia coli*: roles of initiator tRNA and initiation factors IF2 and IF3. *Mol. Microbiol.*, 67(5):1012–1026 (2008).
- Yoshizawa S, Fourmy D und Puglisi JD. Recognition of the codon-anticodon helix by ribosomal RNA. Science, 285(5434):1722-1725 (1999).
- Yu NJ und Spremulli LL. Regulation of the activity of chloroplast translational initiation factor 3 by NH2- and COOH-terminal extensions. J Biol Chem, 273(7):3871–3877 (1998).
- Zeltz P, Hess WR, Neckermann K, Börner T und Kössel H. Editing of the chloroplast rpoB transcript is independent of chloroplast translation and shows different patterns in barley and maize. *EMBO J*, 12(11):4291-4296 (1993).
- Zerges W. Translation in chloroplasts. *Biochimie*, 82(6-7):583-601 (2000).
- Zhang J und Deutscher MP. A uridine-rich sequence required for translation of prokaryotic mRNA. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 89(7):2605–2609 (1992).
- Zhou F, Badillo-Corona JA, Karcher D, Gonzalez-Rabade N, Piepenburg K, Borchers AMI, Maloney AP, Kavanagh TA, Gray JC und Bock R. High-level expression of human immunodeficiency virus antigens from the tobacco and tomato plastid genomes. *Plant Biotechnol J* (2008).
- Zubko MK und Day A. Stable albinism induced without mutagenesis: a model for ribosome-free plastid inheritance. *Plant J*, 15(2):265–271 (1998).
- Zubko MK und Day A. Differential regulation of genes transcribed by nucleus-encoded plastid RNA polymerase and and DNA amplification and within ribosome-deficient plastids in stable phenocopies of cereal albino mutants. *Mol. Genet. Genomics*, 267(1):27–37 (2002).
- Zuker M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucl. Acids Res.*, 31(13):3406-3415 (2003).

## A Anhang



Abbildung A.1: in silico-Faltung der 5'UTR von pOD 1. Grün hervor gehoben ist die SD-Sequenz. Die freie Enthalpie der Faltung liegt bei  $\Delta G = -13,8 \text{ kJ/mol}.$ 



Abbildung A.2: in silico-Faltung der 5'UTR von pOD 2. Grün hervor gehoben sind die SD-Sequenzen. Die freie Enthalpie der Faltung liegt bei  $\Delta G = -20, 48 \text{ kJ/mol}.$ 



Abbildung A.3: in silico-Faltung der 5'UTR von pOD 3. Grün hervor gehoben sind die SD-Sequenzen. Die freie Enthalpie der Faltung liegt bei  $\Delta G = -30,08 \text{ kJ/mol}.$ 



Abbildung A.4: in silico-Faltung der 5'UTR von pOD 4. Grün hervor gehoben sind die SD-Sequenzen. Die freie Enthalpie der Faltung liegt bei  $\Delta G = -12.8 \text{ kJ/mol}$ .



Abbildung A.5: in silico-Faltung der 5'UTR von pOD 5. Grün hervor gehoben sind die SD-Sequenzen. Die freie Enthalpie der Faltung liegt bei  $\Delta G = -20,84 \text{ kJ/mol}.$ 



Abbildung A.6: in silico-Faltung der 5'UTR von pOD 6. Grün hervor gehoben sind die SD-Sequenzen. Die freie Enthalpie der Faltung liegt bei  $\Delta G = -14, 4 \text{ kJ/mol}$ .



Abbildung A.7: in silico-Faltung der 5'UTR von pOD 7. Grün hervor gehoben sind die SD-Sequenzen. Die freie Enthalpie der Faltung liegt bei  $\Delta G = -15, 6 \text{ kJ/mol}.$ 



Abbildung A.8: in silico-Faltung der 5'UTR von pOD 8. Grün hervor gehoben sind die SD-Sequenzen. Die freie Enthalpie der Faltung liegt bei  $\Delta G = -19.8 \text{ kJ/mol}$ .



Abbildung A.9: in silico-Faltung der 5'UTR von pOD 9. Grün hervor gehoben sind die SD-Sequenzen. Die freie Enthalpie der Faltung liegt bei  $\Delta G = -22, 3 \text{ kJ/mol}.$ 



Abbildung A.10: in silico-Faltung der 5' UTR von pOD 11. Grün hervor gehoben sind die SD-Sequenzen. Die freie Enthalpie der Faltung liegt bei  $\Delta G = -22, 11 \text{ kJ/mol.}$ 



Abbildung A.11: in silico-Faltung der 5' UTR von pOD 12. Grün hervor gehoben sind die SD-Sequenzen. Die freie Enthalpie der Faltung liegt bei  $\Delta G = -26, 12 \text{ kJ/mol}.$ 



Abbildung A.12: in silico-Faltung der 5'UTR von pOD 13. Grün hervor gehoben ist die SD-Sequenz. Die freie Enthalpie der Faltung liegt bei  $\Delta G = -23,8 \text{ kJ/mol.}$ 



Abbildung A.13: in silico-Faltung der 5' UTR von pOD 14. Grün hervor gehoben sind die SD-Sequenzen. Die freie Enthalpie der Faltung liegt bei  $\Delta G = -31, 91 \text{ kJ/mol.}$ 



Abbildung A.14: in silico-Faltung der 5' UTR von pOD 15. Grün hervor gehoben sind die SD-Sequenzen. Die freie Enthalpie der Faltung liegt bei  $\Delta G = -35, 53 \text{ kJ/mol}.$ 



Abbildung A.15: in silico-Faltung der 5' UTR von pOD 17. Grün hervor gehoben sind die SD-Sequenzen. Die freie Enthalpie der Faltung liegt bei  $\Delta G = -18, 2 \text{ kJ/mol}$ .



Abbildung A.16: in silico-Faltung der 5' UTR von pOD 18. Grün hervor gehoben sind die SD-Sequenzen. Die freie Enthalpie der Faltung liegt bei  $\Delta G = -16, 43 \text{ kJ/mol}.$ 



Abbildung A.17: in silico-Faltung der 5'UTR von pOD 19. Grün hervor gehoben ist die SD-Sequenz. Die freie Enthalpie der Faltung liegt bei  $\Delta G = -16, 60 \text{ kJ/mol}.$ 



Abbildung A.18: in silico-Faltung der 5' UTR von pOD 20. Grün hervor gehoben sind die SD-Sequenzen. Die freie Enthalpie der Faltung liegt bei  $\Delta G = -28 \text{ kJ/mol}$ .



Abbildung A.19: in silico-Faltung der 5' UTR von pOD 21. Grün hervor gehoben sind die SD-Sequenzen. Die freie Enthalpie der Faltung liegt bei  $\Delta G = -30,79 \text{ kJ/mol.}$ 



Abbildung A.20: in silico-Faltung der 5' UTR von pOD 22. Grün hervor gehoben sind die SD-Sequenzen. Die freie Enthalpie der Faltung liegt bei  $\Delta G = -44,99 \, \text{kJ/mol}.$ 

Gen		Mu	itation	
	P. roseum P. zonale cv. TB	P. roseum P. zonale cv. SB	<i>P.z.</i> cv. TB <i>P.z.</i> cv. SB	Mutationen mit Konsequenz   für die Aminosäuresequenz
atpA	$C \rightarrow T$ (729)	$C \rightarrow T$ (729)	=	
atpA	$T \rightarrow G (1383)$	$T \rightarrow G (1383)$	=	$F \rightarrow L$
atpB	$A \rightarrow C$ (543)	$A \rightarrow C$ (543)	=	
atpB	$C \rightarrow A (963)$	$C \rightarrow A (963)$	=	
atpB	$C \rightarrow A (1375)$	$C \rightarrow A (1375)$	=	$H \rightarrow N$
atpF	$A \rightarrow G$ (358)	$A \rightarrow G$ (358)	=	$N \rightarrow D$
atpF	$A \rightarrow C$ (363)	$A \rightarrow C$ (363)	=	$L \rightarrow F$
atpH	$G \rightarrow C$ (171)	$G \rightarrow C$ (171)	=	
ccsA	$C \rightarrow A (253)$	$C \rightarrow A (253)$	=	L→I
ccsA	$C \rightarrow G (367)$	$C \rightarrow G (367)$	=	$Q \rightarrow E$
ccsA	$C \rightarrow A (378)$	$C \rightarrow A (378)$	=	
ccsA	$C \rightarrow T$ (557)	$C \rightarrow T$ (557)	=	$T \rightarrow I$
ccsA	$C \rightarrow A$ (676)	$C \rightarrow A (676)$	=	$L \rightarrow I$
clpP	$G \rightarrow T$ (528)	$G \rightarrow T$ (528)	=	$\mid \mathbf{Q} \rightarrow \mathbf{H}$
clpP	$G \rightarrow A (553)$	$G \rightarrow A (553)$	=	$V \rightarrow I$
matK	$C \rightarrow T$ (417)	$C \rightarrow T$ (417)	=	
matK	$C \rightarrow A (419)$	$C \rightarrow A$ (419)	=	$A \rightarrow E$
matK	$G \rightarrow C(503)$	$G \rightarrow C$ (503)	=	$W \rightarrow S$
matK	$G \rightarrow T$ (756)	$G \rightarrow T$ (756)	=	$M \rightarrow I$
matK	$A \rightarrow C (1059)$	$A \rightarrow C (1059)$	=	$E \rightarrow D$
matK	=	$T \rightarrow C (1173)$	$T \rightarrow C (1173)$	
matK	$C \rightarrow A (1399)$	$C \rightarrow A (1399)$	=	L→I
matK	$T \rightarrow C (1429)$	$T \rightarrow C (1429)$	=	$  F \rightarrow L$
ndhA	=	Del CTT	Del CTT	$\mid L \rightarrow /$
77 4	A (1000)	(553-555)	(553-555)	
ndhA	$A \rightarrow C (1008)$	$A \rightarrow C (1008)$	=	
ndhD	$A \rightarrow G$ (720)	$A \rightarrow G$ (720)	=	
ndhD	$T \rightarrow C (1354)$	$T \rightarrow C (1354)$	=	$S \rightarrow P$
ndhE	$A \rightarrow C$ (129)	$A \rightarrow C$ (129)	=	
ndhG	$G \rightarrow C$ (283)	$G \rightarrow C$ (283)	=	$  V \rightarrow L$
ndhG	$A \rightarrow G (397)$	=	$A \rightarrow G$ (397)	$I \rightarrow V$
ndhI	$G \rightarrow T$ (477)	$G \rightarrow T$ (477)	=	$\mid L \rightarrow F$
ndhJ	$C \rightarrow G$ (88)	$C \rightarrow G$ (88)	=	$Q \rightarrow E$
ndhJ	$TG \rightarrow CA$ (231)	$TG \rightarrow CA$ (231)	=	GV→GI
ndhJ	$C \rightarrow G (271)$	$C \rightarrow G (271)$	=	$P \rightarrow A$
ndhK	$G \rightarrow C$ (189)	$G \rightarrow C$ (189)	=	

Tabelle A.1: Zusammenstellung aller Basenaustausche, Insertionen und Deletionen der Plastome von *P. zonale* cv. Stadt Bern (SB) und *P. zonale* cv. Trautlieb (TB) im Vergleich zu *P. roseum*. Zusätzlich sind die Veränderungen auf Proteinebene mit angegeben, sollte es sich bei dem ermittelten Sequenzunterschied um eine nicht-stille Mutation handeln.

Gen		Mutation			
	P. roseum P. zonale cv. TB	P. roseum P. zonale cv. SB	<i>P.z.</i> cv. TB <i>P.z.</i> cv. SB	Mutationen mit Konsequenz   für die Aminosäuresequenz	
petB	=	ins CTCAAT	ins CTCAAT	$  / \rightarrow LN$	
psaA	=	$A \rightarrow G$ (606)	$G \rightarrow A (606)$		
psaB	$A \rightarrow C$ (624)	$A \rightarrow C$ (624)	=		
psaB	$A \rightarrow C$ (636)	$A \rightarrow C$ (636)	=	$L \rightarrow F$	
psaB	$C \rightarrow A (1532)$	$C \rightarrow A (1532)$	=	$  T \rightarrow K$	
psaC	$A \rightarrow G$ (180)	$A \rightarrow G$ (180)	=		
psaI	$A \rightarrow G$ (73)	$A \rightarrow G$ (73)	=	$\mid T \rightarrow A$	
psbA	$T \rightarrow C (1044)$	$T \rightarrow C (1044)$	=		
psbK	$A \rightarrow C$ (34)	$A \rightarrow C$ (34)	=	$\mid I \rightarrow L$	
10		·	· cm		
rpl2 rpl14	$=$ A $\rightarrow$ G (79)	$ \begin{array}{c} \text{Ins GTA} \\ \text{A} \rightarrow \text{G} \ (79) \end{array} $	=	$\begin{vmatrix} T \rightarrow ST \\ T \rightarrow A \end{vmatrix}$	
rpl16	$C \rightarrow A$ (337)	$C \rightarrow A$ (337)	=	L→I	
rpl20	$G \rightarrow C$ (265)	$G \rightarrow C$ (265)	=	$\mid E \rightarrow Q$	
rpl22	$G{\rightarrow}T$ (18)	$G \!  ightarrow \! T$ (18)	=	K H	
rpl23	$G{\rightarrow}T~(263)$	$G \rightarrow T$ (263)	=	R→I	
100					
rp132 rp132	$ \begin{array}{c} A \rightarrow C \ (173) \\ C \rightarrow A \ (198) \end{array} $	$ \begin{array}{c} A \rightarrow C \ (173) \\ C \rightarrow A \ (198) \end{array} $	=	$Y \rightarrow S$	
rpl33	$A \rightarrow C$ (128)	$A \rightarrow C$ (128)	=	$  Q \rightarrow P$	
rpl36	$A \rightarrow C$ (43)	$A \rightarrow C$ (43)	=	$\mid K \rightarrow Q$	
rnoB	$A \rightarrow G$ (120)	$A \rightarrow G$ (120)	=	1	
rno B	$C \rightarrow A (140)$	$C \rightarrow A (140)$	=	$S \rightarrow Y$	
rpoB	$T \rightarrow G (627)$	$T \rightarrow G (627)$	=		
rpoB	$G \rightarrow A (643)$	$G \rightarrow A (643)$	=	$  E \rightarrow K$	
rpoB	$A \rightarrow G(653)$	$A \rightarrow G(653)$	=	$E \rightarrow G$	
rpoB	$G \rightarrow A (667)$	$G \rightarrow A (667)$	=	$E \rightarrow K$	
rpoB	$G \rightarrow T$ (670)	$G \rightarrow T$ (670)	=	$  D \rightarrow Y$	
rpoB	$A \rightarrow C(692)$	$A \rightarrow C(692)$	=	$  E \rightarrow A$	
rpoB	$A \rightarrow C(708)$	$A \rightarrow C(708)$	=	$  L \rightarrow F$	
rpoB	del (ACTGAA)	del (ACTGAA)	=	$  \text{TE} \rightarrow /$	
rpoB	$G \rightarrow A (724)$	$G \rightarrow A (724)$	=	$E \rightarrow K$	
rpoB	$G \rightarrow A (767)$	$G \rightarrow A$ (767)	=	$R \rightarrow K$	
rpoB	$A \rightarrow C (1424)$	$A \rightarrow C (1424)$	=	$  Y \rightarrow S$	
rpoB	$T \rightarrow G (2421)$	$T \rightarrow G (2421)$	=	$  S \rightarrow R$	
rpoB	$G \rightarrow A (2637)$	$G \rightarrow A (2637)$	=		
rpoB	$G \rightarrow T$ (3160)	$G \rightarrow T$ (3160)	=	$  A \rightarrow S$	
rpoB	$T \rightarrow G (3228)$	$T \rightarrow G (3228)$	=	$\mid I \rightarrow M$	
rpoB	$A \rightarrow G (3235)$	$A \rightarrow G (3235)$	=	$\mid M \rightarrow V$	
rpoC1	$C \rightarrow A$ (10)	$C \rightarrow A$ (10)	=	$  Q \rightarrow K$	

Gen	Mutation				
	P. roseum P. zonale cv. TB	P. roseum P. zonale cv. SB	<i>P.z.</i> cv. TB <i>P.z.</i> cv. SB	Mutationen mit Konsequenz   für die Aminosäuresequenz	
rpoC1	$T \rightarrow G (145)$	$T \rightarrow G (145)$	=	I→R	
rpoC1	$C \rightarrow G (176)$	$C \rightarrow G (176)$	=	$T \rightarrow R$	
rpoC1	$G \rightarrow A$ (179)	$G \rightarrow A$ (179)	=	$G \rightarrow D$	
rpoC1	$A \rightarrow C$ (472)	$A \rightarrow C$ (472)	=	I→L	
rpoC1	Del (544)	Del (544)	=	$GSGSGSRS \rightarrow /$	
rpoC1	$A \rightarrow C$ (607)	$A \rightarrow C$ (607)	=	$  K \rightarrow Q$	
rpoC1	$A \rightarrow G (736)$	$A \rightarrow G (736)$	=	$K \rightarrow E$	
rpoC1	$A \rightarrow G (763)$	$A \rightarrow G (763)$	=	$K \rightarrow E$	
rpoC1	Ins (766)	Ins (766)	=	$/\rightarrow RTE$	
rpoC1	$A \rightarrow G (775)$	$A \rightarrow G (775)$	=	$K \rightarrow E$	
rpoC1	$\mathbf{C} \rightarrow \mathbf{A} (782)$	$C \rightarrow A (782)$	=	$ \begin{array}{c} A \rightarrow D \\ F \rightarrow V \end{array} $	
rpoC1	$G \rightarrow A (802)$ $C \rightarrow T (002)$	$G \rightarrow A (802)$ $C \rightarrow T (002)$	_	$E \rightarrow K$	
rpoC1	$G \rightarrow I (995)$ $C \rightarrow \Lambda (005)$	$G \rightarrow 1 (995)$ $C \rightarrow \Lambda (005)$	_	$ \begin{array}{c} \mathbf{n} \longrightarrow \mathbf{S} \\ \mathbf{T} \longrightarrow \mathbf{N} \end{array} $	
rpoC1			_		
rpoC1 rpoC1	$\mathbf{G} \rightarrow \mathbf{C} (1020)$	$\mathbf{G} \rightarrow \mathbf{C} (1020)$	_	$E \rightarrow O$	
rpoC1	$G \rightarrow T (1070)$	$G \rightarrow T (1070)$	=	$B \rightarrow I$	
rpoC1	$C \rightarrow T (1079)$	$C \rightarrow T (1079)$	=	$A \rightarrow V$	
rpoC1	$AC \rightarrow CA (1090)$	$AC \rightarrow CA (1090)$	=	$T \rightarrow Q$	
rpoC1	$G \rightarrow A (1111)$	$G \rightarrow A$ (1111)	=	$G \rightarrow S$	
rpoC1	$G \rightarrow C(1144)$	$G \rightarrow C(1144)$	=	$V \rightarrow L$	
rpoC1	$G \rightarrow C (1195)$	$G \rightarrow C (1195)$	=	$E \rightarrow Q$	
rpoC1	$T \rightarrow G$ (2107)	$T \rightarrow G (2107)$	=	$  Y \rightarrow D$	
rpoC2	Ins $(13)$	Ins $(13)$	=	P→PP	
rpoC2	$T \rightarrow G$ (704)	$T \rightarrow G$ (704)	=	$V \rightarrow G$	
rpoC2	$G \rightarrow C$ (2143)	$G \rightarrow C (2143)$	=	$G \rightarrow R$	
rpoC2	$G \rightarrow A (2337)$	$G \rightarrow A (2337)$	=		
rpoC2	$G \rightarrow A (2343)$	$G \rightarrow A (2343)$	=		
rpoC2	$T \rightarrow G (2946)$	$T \rightarrow G (2946)$	=	$S \rightarrow R$	
rpoC2	$T \rightarrow G (3059)$	$T \rightarrow G (3059)$	=	$\bigvee \rightarrow G$	
rpoC2	$G \rightarrow C (3132)$	$G \rightarrow C (3132)$	=	$K \rightarrow N$	
rpoC2	$G \rightarrow C (3215)$ $A \rightarrow C (2517)$	$G \rightarrow C (3215)$ $A \rightarrow C (2517)$	=	$ \begin{array}{c} \mathbf{R} \rightarrow \mathbf{I} \\ \mathbf{C} \rightarrow \mathbf{D} \end{array} $	
rpoCz	$A \rightarrow \bigcup (3517)$ $C \rightarrow A (2522)$	$A \rightarrow \bigcup (3517)$ $C \rightarrow A (2522)$	_	$\begin{array}{ } \mathbf{S} \rightarrow \mathbf{R} \\ \mathbf{A} \rightarrow \mathbf{D} \end{array}$	
rpoC2	$C \rightarrow A (3333)$ T $\rightarrow C (3841)$	$C \rightarrow A (3333)$ $T \rightarrow C (3841)$	_	$A \rightarrow D$ $I \rightarrow V$	
rpoC2	$GGCAAC \rightarrow AAAAAT$	$GGCAAC \rightarrow AAAAAT$	_		
1002	(4037)	(4037)	—		
rpoC2	$A \rightarrow C$ (4066)	$A \rightarrow C (4066)$	=	$  K \rightarrow Q$	
rpoC2	$A \rightarrow G (4120)$	=	$\mathbf{G} {\rightarrow} \mathbf{A} ~(4120)$	R→G	
rps2	$G \rightarrow A$ (42)	$G \rightarrow A$ (42)	=		
rps4	$A \rightarrow G$ (23)	$A \rightarrow G$ (23)	=	$H \rightarrow R$	
rps4	$T \rightarrow C (490)$	$T \rightarrow C$ (490)	=	$S \rightarrow P$	
rps4	ins (TCACCC)	ins $(TCACCC)$	=	$ /\rightarrow$ SP	
rps14	$G \rightarrow T$ (252)	$G \rightarrow T$ (252)	=		
rps16	$C \rightarrow A$ (37)	$C \rightarrow A$ (37)	=	Q→K	
rps16	$C \rightarrow A (144)$	$C \rightarrow A (144)$	=	$  \tilde{\mathbf{F}} \rightarrow \mathbf{L}$	
r		× /			
rps18	$C \rightarrow A (386)$	$C \rightarrow A (386)$	=	$\mid T \rightarrow K$	
rps19	$A \rightarrow C$ (126)	$A \rightarrow C$ (126)	=		

Gen	Mutation			
	P. roseum P. zonale cv. TB	P. roseum P. zonale cv. SB	<i>P.z.</i> cv. TB <i>P.z.</i> cv. SB	Mutationen mit Konsequenz   für die Aminosäuresequenz
rrn16 rrn16	$\begin{array}{c} C \rightarrow T  (576) \\ G \rightarrow A  (998) \end{array}$	$\begin{array}{c} C \rightarrow T \ (576) \\ G \rightarrow A \ (998) \end{array}$	=	
ycf1	del $(1056)$	del $(1056)$	=	$ $ LEEEENQEILD $\rightarrow$ /
ycf2 ycf2 ycf2 ycf2 ycf2	$\begin{array}{l} \mathbf{G} \rightarrow \mathbf{A} \ (452) \\ \mathbf{A} \rightarrow \mathbf{C} \ (655) \\ \mathbf{C} \rightarrow \mathbf{A} \ (1597) \\ \mathbf{T} \rightarrow \mathbf{G} \ (3430) \end{array}$	$\begin{array}{l} \mathbf{G} \rightarrow \mathbf{A} \ (452) \\ \mathbf{A} \rightarrow \mathbf{C} \ (655) \\ \mathbf{C} \rightarrow \mathbf{A} \ (1597) \\ \mathbf{T} \rightarrow \mathbf{G} \ (3430) \end{array}$	= = =	$ \begin{array}{c c} R \rightarrow K \\ M \rightarrow L \\ Q \rightarrow K \\ S \rightarrow A \end{array} $

Tabelle A.2: Zusammenstellung der Codonhäufigkeiten in *P. roseum, P. zonale* cv. Trautlieb, *P. zonale* cv. Stadt Bern und *P. zonale* cv. Ringo White. Unter Beachtung von "Wobbling" sind die Codons komplementär zu *trnT*-GGU hervorgehoben, welche nicht im Plastom der drei untersuchten Pflanzen vorhanden war.

Aminosäure	Codon	P. roseum	P. zonale	P. zonale	P. zonale
			cv. Trautlieb	cv. Stadt Bern	cv. Ringo White
	CCA	0.0140	0.0141	0.0141	0.01/3
А	CCC	0,0140	0,0141	0,0141	0,0143 0.0101
	CCC	0,0101	0,0101	0,0101	0,0101
	CCT	0,0072	0,0073	0,0072	0,0072
С	TGT	0,0259 0.0076	0,0259 0.0076	0,0259 0.0076	0,0241 0.0076
U		0,0070	0,0070	0,0070	0,0070
D	GAT	0,0030	0,0050	0,0050	0,0030
D	GAC	0,0282	0,0285	0,0285	0,0284
Б	CAA	0,0108	0,0110	0,0110	0,0109
Ľ	CAC	0,0387 0.0179	0,0335 0.0170	0,0385	0,0385 0.0171
Б	UAG TTC	0,0172 0.0212	0,0170	0,0170	0,0171
Ľ		0,0212	0,0212	0,0212	0,0213
С		0,0301	0,0301	0,0301	0,0379
G	CCC	0,0227	0,0227	0,0227	0,0227
		0,0084	0,0084	0,0084	0,0085
	CCT	0,0129	0,0130	0,0130	0,0130
ц		0,0202 0.0152	0,0202 0.0152	0,0202 0.0152	0,0204
11		0,0152	0,0152	0,0152	0,0149
т		0,0009	0,0009	0,0009	0,0008
1		0,0239 0.0177	0,0241 0.0178	0,0241 0.0178	0,0242 0.0178
	ATC	0,0177	0,0178	0,0176	0,0178
V		0,0300	0,0300	0,0300	0,0359
N		0,0450 0.0204	0,0401 0.0204	0,0400 0.0204	0,0401
т		0,0204	0,0204	0,0204	0,0203
L	TTC	0,0299	0,0299	0,0299	0,0298
		0,0234 0.0151	0,0233	0,0233	0,0232
	CTC	0,0131	0,0149	0,0149	0,0148
	CTC	0,0080	0,0088	0,0088	0,0088
	CTT	0,0079	0,0079	0,0079	0,0079
м		0,0272	0,0275	0,0272	0,0209
N	AIG	0,0228	0,0228	0,0228	0,0230
1N		0,0289	0,0289	0,0290	0,0288
0		0,0100	0.0255	0.0255	0,0107
Ч Ч	CAG	0,0230	0,0233	0,0233	0,0200
D	CCAG	0,0000	0,0080	0,0080	0,0007
Г	UUA	0,0111	0,0111	0,0111	0,0112

Aminosäure	Codon	P. roseum	<i>P. zonale</i> cv. Trautlieb	<i>P. zonale</i> cv. Stadt Bern	<i>P. zonale</i> cv. Ringo White
	CCC	0,0094	0,0094	0,0094	0,0094
	CCG	0,0066	0,0066	0,0066	0,0067
	CCT	0,0163	0,0163	0,0163	0,0165
R	CGA	0,0135	0,0135	0,0135	0,0135
	CGC	0,0060	0,0061	0,0061	0,0062
	CGG	0,0055	0,0055	0,0055	0,0054
	CGT	0,0139	0,0140	0,0140	0,0141
	AGA	0,0195	0,0194	0,0194	0,0195
	AGG	0,0089	0,0088	0,0088	0,0088
S	TCA	0,0131	0,0131	0,0131	0,0129
	TCC	0,0120	0,0120	0,0120	0,0119
	TCG	0,0074	0,0073	0,0073	0,0073
	TCT	0,0200	0,0201	0,0201	0,0198
	AGT	0,0132	0,0132	0,0132	0,0131
	AGC	0,0064	0,0064	0,0064	0,0064
Т	ACA	0,0144	0,0143	0,0143	0,0145
	ACC	0,0102	0,0101	0,0101	0,0103
	ACG	0,0058	0,0058	0,0058	0,0059
	ACT	0,0211	0,0209	0,0209	0,0211
V	GTA	0,0169	0,0169	0,0169	0,0169
	GTC	0,0082	0,0083	0,0083	0,0083
	GTG	0,0084	0,0083	0,0083	0,0083
	GTT	0,0195	0,0195	0,0195	0,0197
W	TGG	0,0177	0,0177	0,0177	0,0178
Υ	TAC	0,0076	0,0076	0,0076	0,0075
	TAT	0,0282	0,0281	0,0281	0,0280



Abbildung A.21: Physische Karte des Plastidengenoms von *Pelargonium zonale* cv. Stadt Bern. Gene innerhalb des Hauptkreises werden im Uhrzeigersinn, die außerhalb entgegengesetzt transkribiert. Der innere Kreis markiert die Position der invertierten Duplikationen. Die Darstellung wurde mit OGDraw (Lohse *et al.*, 2007, Kap. 3.7.3) erzeugt.



Abbildung A.22: Physische Karte des Plastidengenoms von *Pelargonium zonale* cv. Trautlieb. Gene innerhalb des Hauptkreises werden im Uhrzeigersinn, die außerhalb entgegengesetzt transkribiert. Der innere Kreis markiert die Position der invertierten Duplikationen. Die Darstellung wurde mit OGDraw (Lohse *et al.*, 2007, Kap. 3.7.3) erzeugt.



Abbildung A.23: Physische Karte des Plastidengenoms von *Pelargonium roseum*. Gene innerhalb des Hauptkreises werden im Uhrzeigersinn, die außerhalb entgegengesetzt transkribiert. Der innere Kreis markiert die Position der invertierten Duplikationen. Die Darstellung wurde mit OGDraw (Lohse *et al.*, 2007, Kap. 3.7.3) erzeugt.

## Danksagung

Ohne die Hilfe und geduldige Unterstützung, die ich von so Vielen im und um das Institut erfahren habe, wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen.

Zuallererst möchte ich Prof. Ralph Bock danken, dass ich an diesen spannenden Projekten arbeiten konnte. Geduldig wurden größere Wissenslücken oder fragwürdige Vorschläge höchstens mit einem Stirnrunzeln erwidert.

Weiterhin schulde ich Prof. Johanningmeier, Prof. Müller-Röber und Prof. Schmitz-Linneweber Dank für die Zeit, die in die Begutachtung dieser Arbeit geflossen ist.

In Heldengedenken werde ich all die Korrekturleser behalten, die mit wertvollen Vorschlägen zum Feinschliff dieser Arbeit beigetragen haben. Hierfür möchte ich allen voran Ralph und Lars und ebenso Mark S., Daniel, Sabine und Kerstin für ihre Mühen und wertvolle Zeit danken. Eine nahezu unerschöpfliche Menge Zeit wandte die gesamte Arbeitsgruppe auf, um meinen Fragen Rede und Antwort zu stehen. Hierzu zählt im Besonderen Daniel Karcher, den man in nahezu jeder Lebenslage zu Fragen der Molekularbiologie und dem Ringsherum stellen konnte. Wenn es um die physiologischen Prozesse im Plastiden ging, konnte man immer Mark "Schötti" Schöttler Löcher in den Bauch fragen. Ebenso viel Geduld brachten die Mitglieder des Trafo-Teams (Annett, Claudia H. und Steffi) auf, wenn es darum ging, mir die Gewebekultur näher zu bringen. Vielen Dank auch für die Hilfe im Labor und die unterhaltsamen Stunden außerhalb der Mauern des MPI an Anja, Annemarie, Britta, Claudia F., Olga und Steffi. Immer, wenn sich Räder drehten oder eine neue Bar ausgekundschaftet wurde, waren alle dabei.

Ein dickes Dankeschön auch an Anne, die mir die Anfangszeit in der AG sehr erleichtert hat und auf dem Parkett eine Menge beigebracht hat. Wenn es um die Möglichkeit Elektronen durch Silizium zu jagen oder eine Frage zum Umgang mit Nukleotidsequenzen aufkam, konnte man immer auf Sabine zählen. Weiterer Dank gebührt dem Team des Hauses mit dem grünen Daumen (Britta Hausmann, Helga Kulka und Karin Köhl), ohne die es nur wenig Material zur Bearbeitung der beschriebenen Projekte gegeben hätte. Für wertvolle Diskussionen und gute Ideen möchte ich der Bürobesatzung (Juliane, Kerstin und Lars) danken. Kerstin auch besonders für eine ausreichende Anzahl an Computerproblemen, die dann teilweise doch vom IT-Team gelöst werden mussten, wobei ich auch noch diverse Fragen aufwerfen durfte. An dieser Stelle gebührt auch Marc Lohse Dank, durch den ich meine Affinität zu grüner Schrift vor schwarzem Hintergrund entdeckte.

Viel gelernt habe ich auch in meiner Zeit als Doktorandenvertreter, die durch Borjana Arsova, Christin Albus, Nadine Tiller und Wolfgang Engelsberger besonders erleichtert wurde.

Ging es darum, die Kette um den Kranz zu kurbeln oder Federbälle durch die Luft zu befördern, konnte man immer auf Fanny, Katja und Thomas zählen. Die endlosen Diskussionen über alles und nichts werden weiter gehen und die nächste Radtour ist nicht mehr fern. Ebenso meinen "alten" Mitstreitern André, Erik, Sascha, Katrin und Katrin vielen Dank. Hier auch ganz besonders  ${\rm L\!A}T_{\rm E}X$ -Sascha für die Hilfe bei kleinen und großen Problemen.

Abschließend möchte ich denjenigen danken, die den Weg bis zu dieser Arbeit überhaupt ermöglicht haben – meine Familie und gerade in der letzten Zeit mit einem unerschöpflichen Vorrat an Geduld Nadine.

Also vielen Dank an alle, auch die, die ich hier nicht namentlich aufführen konnte.