

Vergleichende Analysen
zum plastidären Kodierungspotential
und zur plastidären Genexpression
von verschiedenen Arten
der holoparasitisch lebenden
Blütenpflanzengattung *Cuscuta*

Dissertation

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



vorgelegt von

Sabine Berg

aus Telgte

Kiel, im Mai 2003

Referentin:

Koreferent:

Tag der mündlichen Prüfung:

Zum Druck genehmigt:

Kiel, den

Der Dekan

Meinen Eltern

Diese Arbeit wurde gefördert durch ein Graduiertenstipendium der
Friedrich-Naumann-Stiftung aus Mitteln des BMBF.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Evolution und Funktion der Plastiden	1
1.2 Das Plastidengenom	2
1.3 Plastidäre Transkription	4
1.3.1 Regulation der Genexpression in den Plastiden	4
Transkriptionelle Regulation	6
Posttranskriptionelle Regulation	6
Translationelle Regulation	7
1.3.2 Plastidäre RNA-Polymerasen	8
Plastomkodierte RNA-Polymerase (PEP)	8
Kernkodierte RNA-Polymerase (NEP)	9
Plastidäre Promotoren	10
1.4 Parasitische Blütenpflanzen als Modellorganismen	12
1.4.1 Lebensweise und Vorkommen parasitischer Blütenpflanzen	12
1.4.2 Die Gattung <i>Cuscuta</i>	13
1.4.3 Evolution des Plastidengenoms in Holoparasiten	16
1.4.4 Plastidäre Transkription in parasitisch lebenden Pflanzen	17
2 Zielsetzung	19
3 Material und Methoden	21
3.1 Pflanzenmaterial	21
3.2 Chemikalien und Enzyme	21

Inhaltsverzeichnis

3.3	Vektoren und Bakterienstämme	21
3.4	Plastidengenomklone und Oligonukleotide	22
3.5	Stammlösungen	23
3.6	Allgemeine Methoden zum Arbeiten mit Nukleinsäuren	24
3.6.1	Phenolextraktion	24
3.6.2	Präzipitation von Nukleinsäuren	24
3.6.3	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	25
3.7	Klonierung von DNA-Fragmenten	25
3.7.1	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	25
3.7.2	DNA-Amplifikation durch Polymerase-Kettenreaktion	26
3.7.3	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	26
3.7.4	Isolierung von Vektor-DNA	27
3.7.5	Dephosphorylierung von Vektor-DNA	27
3.7.6	Ligation von Nukleinsäuren	27
3.7.7	Klonierung von PCR-Produkten	27
3.8	Anzucht, Transformation und Lagerung von Bakterien	28
3.8.1	Herstellung von kompetenten Bakterien	28
3.8.2	Anzucht, Transformation und Lagerung von <i>E.coli</i> Kulturen	28
3.9	Koloniehybridisierung	29
3.9.1	Die Fixierung von Bakterienkolonien auf Membranen	29
3.9.2	Markierung von DNA-Sonden mit Digoxigenin, Hybridisierung und kolorimetrische Detektion	29
3.10	Elektrophorese-Techniken	30
3.10.1	Agarose-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren	30
3.10.2	Molekulargewichtsmarker für die Gelelektrophoresen	30
3.11	Plastidenisolierung	30
3.11.1	Isolierung von intakten Chloroplasten aus <i>C. reflexa</i>	30
3.11.2	Mikroskopische Bestimmung der Plastidenzahl	31
3.11.3	Anreicherung von Plastiden aus <i>C. gronovii</i>	32
3.11.4	Anreicherung von Plastiden aus <i>C. odorata</i>	33
3.12	Extraktion von Nukleinsäuren aus Pflanzenmaterial	33
3.12.1	Isolierung von Gesamt-RNA nach Chirgwin	33
3.12.2	Isolierung genomischer DNA aus Pflanzengewebe	34
3.12.3	Isolierung von pDNA	34
3.13	DNA-Sequenzierung und Sequenzanalyse	35
3.13.1	Automatische DNA-Sequenzierung nach Sanger	35
3.13.2	Sequenzanalyse	36
3.14	Analyse von plastidären Primärtranskripten	36

Inhaltsverzeichnis

3.14.1	Primer-Extension-Analyse	36
3.14.2	RNA-Ligation	36
3.14.3	„Run On“-Transkription	37
3.15	„Dot Blot“-Analyse	39
3.15.1	Herstellung von strangspezifischen Sonden durch <i>In vitro</i> -Transkription	39
3.15.2	Herstellung von „Dot Blot“-Filtern	39
3.16	DNA-/RNA-Hybridisierung	40
3.16.1	Kapillartransfer von Nukleinsäuren auf Membranen	40
3.16.2	Radioaktive Markierung von DNA-Sonden durch „Random Primed Labeling“	40
3.16.3	Endmarkierung von RNA	40
3.16.4	Hybridisierung von membrangebundener DNA mit ³² P-markierten Nukleinsäure-Fragmenten	41
3.16.5	Detektion von Hybridisierungssignalen	41
3.16.6	Densitometrische Auswertung von Hybridisierungssignalen	41
4	Ergebnisse	42
4.1	Sequenzanalyse des Plastidenchromosoms von <i>C. reflexa</i>	42
4.1.1	Herstellung einer plastidären Klonbank	42
4.1.2	PCR-Produkte	46
4.2	Struktur und Gengehalt des Plastidenchromosoms von <i>C. reflexa</i>	49
4.2.1	Vergleich kodierender Regionen	49
	Insertionen/Deletionen (Indels)	51
4.2.2	Deletionen	52
	Deletion von tRNAs	52
	Deletion des <i>rps16</i> -Genes	53
	Deletion der <i>ndh</i> -Gene	54
	Deletion eines Replikationsursprungs	54
	Deletionen im <i>psbD</i> -Promotor	55
	Deletionen im <i>rpl32</i> -Promotor	57
4.2.3	Struktur des Plastidenchromosoms	58
	Genumordnungen	59
	Inversionen	60
4.3	Vergleichende Untersuchung der Gengehalte der Plastidenchromosome verschiedener Arten von <i>Cuscuta</i>	61
4.3.1	Größenabschätzung der plDNA untersuchter <i>Cuscuta</i> -Arten im Vergleich zur plDNA von <i>N. tabacum</i>	61

Inhaltsverzeichnis

4.3.2	Analyse einzelner pDNA-Bereiche	64
4.3.3	Analyse der Plastidengene <i>accD</i> und <i>clpP</i>	67
4.4	Vergleich der Transkriptmuster in Plastiden verschiedener <i>Cuscuta</i> -Arten	68
4.4.1	Transkriptionsanalyse mit Plastiden aus <i>Cuscuta reflexa</i> . .	71
4.4.2	Strangspezifische Transkription	72
4.5	Analyse plastidärer Primärtranskripte am Beispiel des <i>rbcL</i> -Genes	74
4.5.1	Amplifikation und Sequenzanalyse des <i>rbcL</i> -Genes in <i>Cuscuta</i>	74
4.5.2	5'-Enden des <i>rbcL</i> -Transkripts	77
5	Diskussion	83
5.1	Größe und Kodierungspotential der Plastidenchromosome der Gattung <i>Cuscuta</i>	83
5.1.1	Die grüne Art <i>C. reflexa</i>	84
	Replikationsursprünge	86
	Analyse von proteinkodierenden Genen	86
	Analyse von offenen Leserahmen unbekannter Funktion .	88
	Deletionen von Genen	88
	Deletionen in intergenischen Bereichen	90
	Translationsrelevante Sequenzelemente	90
5.1.2	Die intermediäre Art <i>C. gronovii</i>	92
5.1.3	Die weiße Art <i>C. odorata</i>	94
5.2	Genexpression in der Gattung <i>Cuscuta</i>	98
5.2.1	NEP-abhängige Transkription	98
5.2.2	PEP-abhängige Transkription	101
6	Ausblick	104
7	Zusammenfassung	106
	Literatur	110
A	Anhang	134
A.1	pDNA-Subklone	134
A.1.1	Hypothetische Plastomkarten	140
A.2	Primer	141

Abbildungsverzeichnis

1	Regulation der Genexpression in Plastiden	5
2	Gruppen parasitisch lebender Pflanzen	14
3	Habitus, Ultrastruktur, Physiologie	15
4	PEP-defiziente Pflanzen	18
5	<i>Bam</i> HI-Fragmente von <i>N. tabacum</i>	23
6	Isolierte Chloroplasten im Phasenkontrast	32
7	Schema der RNA-Ligation	38
8	Gelelektrophorese <i>C. reflexa</i>	43
9	Klon <i>Pst</i> I	45
10	<i>C. reflexa</i> pIDNA-Klone	45
11	<i>Cuscuta reflexa</i> PCR-Fragmente	47
12	Häufigkeit von Nukleotidsubstitutionen	50
13	Häufigkeit von Aminosäuresubstitutionen	50
14	Indels im Plastidenchromosom	51
15	Deletion von <i>trnK</i> und <i>rps16</i>	53
16	<i>rrn5-trnL</i>	54
17	Basenvergleich <i>oriA</i>	55
18	<i>psbD</i> 5'-nichttranslatierten Bereiches	56
19	<i>psbD</i> -Promotorsequenz	57
20	Aminosäurealignment <i>rpl32</i>	57
21	Größenvergleich plastidärer Chromosomen	58
22	<i>rbcL-rps18</i>	59
23	<i>trnC-psbD</i>	60
24	Größenabschätzung des Kodierungspotential	62
25	Zuordnung <i>C. odorata</i>	63
26	pIDNA-Subklon B20	65
27	pIDNA-Subklon B28	66
28	pIDNA-Subklon Ba5	66

Abbildungsverzeichnis

29	<i>Southern blot accD</i> und <i>clpP</i>	67
30	Analyse des Transkriptgehaltes	69
31	Strangspezifische Hybridisierung Gesamt-RNA	70
32	„Run on“-Transkripte aus <i>Cuscuta reflexa</i>	71
33	Strangspezifische Hybridisierung	73
34	PCR und Sequenzanalyse des <i>rbcL</i> -Genes	75
35	<i>rbcL</i> -Promotor	76
36	<i>Primer-Extension</i> -Analyse des <i>rbcL</i> -Genes	78
37	Schematischer Überblick über die <i>rbcL</i> Transkriptionsstarts	80
38	RNA-Ligation prozessierter 5'-Enden	81
39	Sequenzvergleiche ausgewählter NEP-Promotoren	82
40	<i>Cuscuta reflexa</i> -Plastidenchromosom	85
41	Anpassung an den Parasitismus	97
42	Anpassung an den Parasitismus	103
43	pIDNA-Subklon B19	134
44	pIDNA-Subklon B25	135
45	pIDNA-Subklon B7	135
46	pIDNA-Subklon B22	136
47	pIDNA-Subklon Ba1	136
48	pIDNA-Subklon B13	137
49	pIDNA-Subklon B18	137
50	pIDNA-Subklon B27	138
51	PCR-Fragment	138
52	pIDNA-Subklon Ba2	139
53	pIDNA <i>C. reflexa</i> , <i>C. gronovii</i> und <i>C. odorata</i>	140

Tabellenverzeichnis

1	Sequenzierte Plastidengenome	3
2	Plastiden-DNA Fragmente	22
3	Sequenzierung des Plastidenchromosoms aus <i>C. reflexa</i>	44
4	Plastidäre PCR-Produkte aus <i>C. reflexa</i>	46
5	Plastidäre Gene <i>C. reflexa</i>	48
6	Gendeletionen <i>C. reflexa</i>	52

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
<i>A. demin</i>	demineralisiertes Wasser
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
cpm	counts per minute (Impulse pro Minute)
CTP	Cytidintriphosphat
Da	Dalton
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
GTP	Guadinintriphosphat
HEPES	N-2-Hydroxyethylenpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
kb	Kilobasenpaare
mRNA	messenger RNA
MW	Molekulargewicht
NTP	Nukleosidtriphosphat
OD	Optische Dichte
p	Plasmid
³² P	Phosphor-Isotop mit der Atommassenzahl 32
pCp	3'-5'- α - ³² P-Bisphosphat-CTP
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Ketten-Reaktion)

Abkürzungsverzeichnis

pIDNA	Plastiden-DNA
RNA	Ribonukleinsäure
RNAP	RNA-Polymerase
RNase	Ribonuklease
upm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sek.	Sekunde
Std.	Stunde
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transferribonukleinsäure
U	Unit (=Enzymeinheit)
ü.N.	über Nacht
UTR	untranslated region (untranslatierter Bereich)
Vol.	Volumen
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht/Volumen

Abkürzungen von Gennamen

<i>accD</i>	Acetyl-CoA-Carboxylase
<i>atpA, B</i>	α - und β -Untereinheiten der plastidären ATPase
<i>cplP</i>	Untereinheit der Clp-Protease
<i>petD</i>	Untereinheit des Cytochrom b_6/f -Komplexes
<i>psaA, B</i>	Untereinheiten des Photosystems I
<i>psbA, D</i>	Untereinheiten des Photosystems II
<i>rbcL</i>	große Untereinheit der RubisCO
<i>rpoA, B, C1, C2</i>	α -, β -, β' - und β'' -Untereinheiten der plastidären RNAP
<i>rpl, rps</i>	ribosomale Proteine

1 Einleitung

1.1 Evolution und Funktion der Plastiden

Plastiden sind die charakteristischen Organellen pflanzlicher Zellen. Als Ort der Photosynthese, Speicherkompartiment für eine große Anzahl von Molekülen, Syntheseort für essentielle Bausteine der Zelle, wie z.B. Fettsäuren oder Aminosäuren, Kompartiment der Ammoniumassimilation und Produktionsort für phenolische Sekundärmetabolite über den Shikimatweg sind sie wichtige Komponenten im Zusammenspiel der zellulären Funktionen. Charakteristisch für den Aufbau der Plastiden sind zwei Hüllmembranen, die das Stroma mit dem ausgedehnten Membransystem der Thylakoide umschließen. Als semiautonome Organellen besitzen die Plastiden ein eigenes Genom mit Genexpressionsystem und sind somit in der Lage, einige ihrer Proteine selbst zu synthetisieren (s. 1.2).

Die Endosymbiontentheorie begründet die evolutionäre Herkunft der Plastiden wie auch der Mitochondrien. Durch die Aufnahme eines photosynthetisch aktiven Bakteriums durch eine eukaryotische Zelle, die bereits einen Vorläufer der heutigen Mitochondrien enthielt, entstand der Prototyp der heutigen Pflanzenzelle (McFadden 1999). Plastiden mit mehr als zwei Hüllmembranen, z.B. bei Arten der Dinophyten, der Cryptophyten oder der Haptophyten, sind auf sekundäre Endosymbiose zurückzuführen, in der eine photosynthetisch aktive Eukaryotenzelle wiederum durch einen Eukaryoten phagozytiert wurde (McFadden 2001; Stoebe & Maier 2002). Sequenzanalysen der Organellen-DNA und strukturelle Merkmale weisen darauf hin, daß die Plastiden von Vorfahren der heutigen Cyanobakterien abstammen, Mitochondrien von Vorfahren der Purpurbakterien (Gray 1989). Nach einer Phase der Autonomie des Prokaryoten wurde ein Großteil der Gene des Bakteriums in den Kern des Eukaryoten transferiert (Herrmann 1997; Martin & Herrmann 1998). Der Großteil der ursprünglich in den Plastiden kodierten Gene wird dadurch im Zellkern transkribiert, die Proteine werden im Cytoplasma translatiert und in die Plastiden importiert. Dieses machte die Entwicklung einer speziellen Importmaschinerie

notwendig, die den Transport von Proteinen durch die Hüllmembranen katalysiert (Heins & Soll 1998; Heins et al. 1998).

Plastiden sind in einer Vielzahl von Differenzierungstypen zu finden, von denen der photosynthetisch aktive Chloroplast in grünen Geweben der wichtigste ist (Kirk & Tilney-Bassett 1967). Die Plastiden haben in den verschiedenen Geweben einer Pflanze unterschiedliche Funktionen, z.B. als Amyloplasten, Proteinoplasten, Elaioplasten zur Speicherung von Stärke, Proteinen und Fetten in Speichergeweben, Chromoplasten zur Farbgebung von Blütenblättern u.a. (Thomson & Whatley 1980). Die undifferenzierten Vorläufer der Plastiden, die in der Regel maternal vererbt werden, sind die Proplastiden, die im Licht in Chloroplasten umgewandelt werden (Herrmann et al. 1992).

1.2 Das Plastidengenom

Das Plastidengenom, welches das Restgenom des ehemals freilebenden, prokaryotischen Endosymbioten darstellt (s. 1.1), besteht aus einem doppelsträngigen, ringförmigen DNA-Molekül, welches in der Plastide in hoher Kopienzahl vorliegt. Der Chloroplast einer Mesophyllzelle enthält etwa 100 Kopien, so daß bei durchschnittlich 100 Chloroplasten pro Zelle in einer Mesophyllzelle bis zu 10 000 Kopien enthalten sind. Mit einer Größe zwischen 120 und 160 kb (Whitfield & Bottomley 1993; Palmer 1990) (Tab. 1) kodiert das Plastom für eine relativ geringe Anzahl von Genen (100–140), die insgesamt für nur ca. 5% aller plastidären Proteine (Martin et al. 2002) kodieren können. Die restlichen Proteine werden im Cytosol translatiert und in die Plastiden importiert. Der Import von kernkodierten Proteinen bedeutet somit auch ein starkes Abhängigkeitsverhältnis des Organells vom Zellkern (Martin & Herrmann 1998). Die plastomkodierten Gene kodieren für Komponenten des plastidären Transkriptions- und Translationsapparates, Proteine des Photosyntheseapparates und des NADH-Dehydrogenase-Komplexes. Daneben existiert eine Reihe von offenen Leserahmen (*open reading frames*; ORFs und *hypothetical chloroplast reading frames*; *ycfs*), die möglicherweise für solche Polypeptide kodieren, deren Genprodukte bisher nicht identifiziert worden sind (Sugiura 1992).

Der evolutionäre Ursprung der Plastiden (s. 1.1) begründet einige prokaryotische Merkmale des Plastoms (Reith & Munholland 1995; Douglas & Penny 1999; Stoebe & Kowallik 1999). So sind durch die Kompaktheit des Plastidengenoms die nichtkodierenden Bereiche zum Teil sehr kurz; Gene folgen unmittelbar aufeinander oder überlappen sich sogar. Die Struktur der bisher bekannten Plastidengenome der Höheren Pflanzen ist zumeist stark konserviert: Zwei ausge-

1 Einleitung

dehnte gegenläufige Sequenzwiederholungen (*inverted repeat A* und *B*; IR_A und IR_B) trennen zwei einmalige Bereiche (*large* und *small single copy region* /LSC und SSC) voneinander. Abweichungen von dieser Struktur sind jedoch auch bekannt (Tab. 1). Die Anordnung der Gene auf dem Plastidenchromosom ist relativ konserviert, Umordnungen sind selten, kommen aber z.B. bei Koniferen (Strauss et al. 1988), Gräsern (Hiratsuka et al. 1989) und Leguminosen (Palmer et al. 1988) vor.

Tabelle 1 Auflistung aller bisher vollständig sequenzierten Plastidengenome, ihrer Größe und Organisation von Sequenzwiederholungen.

Organismus	Größe (bp)	Sequenzwiederholungen	Referenz
<i>Anthoceros formosae</i>	161162	2, invertiert	Kugita et al. (2003)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	154478	2, invertiert	Sato et al. (1999)
<i>Atropa belladonna</i>	156687	2, invertiert	Schmitz-Linneweber et al. (2002)
<i>Astasia longa</i>	73345	3, direkt	Gockel & Hachtel (2000)
<i>Chaetosphaeridium globosum</i>	131183	2, invertiert	Turmel et al. (2002)
<i>Chlorella vulgaris</i>	150613	keine	Wakasugi et al. (1997)
<i>Cyanidium caldarium</i>	164,921	keine	Glöckner et al. (2000)
<i>Cyanophora paradoxa</i>	135599	2, invertiert	Stirewalt et al. (1995)
<i>Epifagus virginiana</i>	70,028	2, invertiert	Wolfe et al. (1992b)
<i>Euglena gracilis</i>	143170	3, direkt	Hallick et al. (1993)
<i>Guillardia theta</i>	121524	2, invertiert, nicht identisch	Douglas & Penny (1999)
<i>Lotus japonicus</i>	150519	2, invertiert	Kato et al. (2000)
<i>Marchantia polymorpha</i>	121024	2, invertiert	Shimada & Sugiura (1991)
<i>Medicago truncatula</i>	124033	2, invertiert	Lin et al. (2001)
<i>Mesostigma viride</i>	118360	2, invertiert	Lemieux et al. (2000)
<i>Nicotiana tabacum</i>	155,939	2, invertiert	Wakasugi et al. (1998)
<i>Nephroselmis olivacea</i>	200799	2, invertiert	Turmel et al. (1999)
<i>Odontella sinensis</i>	119704	2, invertiert	Kowallik et al. (1995)
<i>Oenothera elata</i>	159443	2, invertiert	Hupfer et al. (2000)
<i>Oryza sativa</i>	134525	2, invertiert	Hiratsuka et al. (1989)
<i>Pinus thunbergii</i>	119707	2, invertiert	Tsudzuki et al. (1992)
<i>Porphyra purpurea</i>	191028	2, direkt, nicht identisch	Reith & Munholland (1995)
<i>Psilotum nudum</i>	138829	2, invertiert	Wakasugi et al. (2002)
<i>Spinacea oleracea</i>	150725	2, invertiert	Schmitz-Linneweber et al. (2001)
<i>Toxoplasma gondii</i>	34996	2, invertiert	Kohler et al. (1997)
<i>Triticum aestivum</i>	134545	2, invertiert	Ogihara et al. (2002)
<i>Zea mays</i>	140387	2, invertiert	Maier et al. (1995)

1.3 Plastidäre Transkription

Die Organisation der Gene in polycistronischen Expressionseinheiten und die differenzielle Genexpression in Plastiden unterschiedlicher Entwicklungsstadien läßt darauf schließen, daß ein komplexes und dynamisches Regulationssystem für die plastidäre Genexpression existiert.

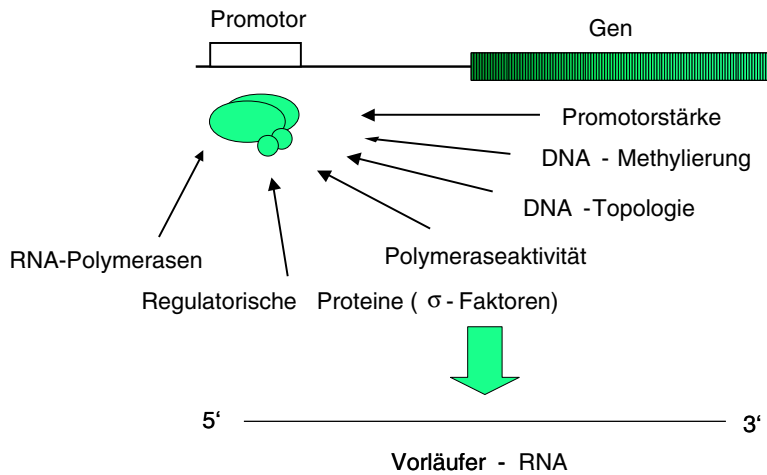
1.3.1 Regulation der Genexpression in den Plastiden

Die Regulation plastidärer Genexpression findet auf unterschiedlichen Ebenen statt: der transkriptionellen, der posttranskriptionellen und der translationalen (Mayfield et al. 1995). Im Gegensatz zu ihren prokaryotischen Vorfahren, deren Genexpression überwiegend auf transkriptioneller Ebene reguliert wird, liegt der regulatorische Schwerpunkt der Genexpression in den Plastiden auf der posttranskriptionellen und translationalen Ebene (Choquet & Wollman 2002). Die unterschiedlichen Ebenen der Genregulation sind nach Gruissem & Tonkyn (1993) in Abbildung 1 zusammengefaßt.

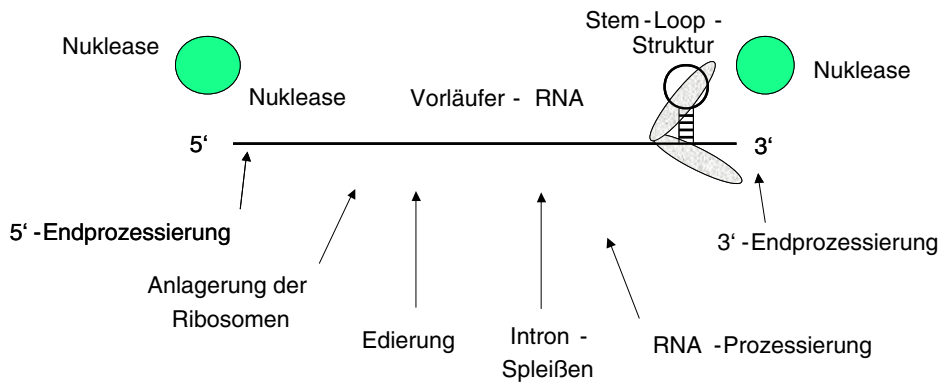
Eine wichtige Rolle bei der Regulation und Kontrolle der plastidären Genexpression spielt die Signaltransduktion zwischen Zellkern und Plastiden. Beispielsweise wird die Expression einiger plastidär kodierter Photosynthesegene, wie die des *psbD*-Gens, durch nukleär kodierte Faktoren reguliert (Christopher & Hoffer 1998). Umgekehrt sind Signale der Plastide wichtig für die Genexpression im Kern. So spielen Feedback-Mechanismen eine Rolle in der Regulation der Photosyntheseeffizienz und der Expression von kernkodierten Photosynthesegenen zur Anpassung der Photosyntheseraten an sich ändernde Umweltbedingungen (Oelmueller 1989; Pfanschmidt et al. 2001; Surpin et al. 2002).

1 Einleitung

A. Transkriptionelle Regulation



B. Posttranskriptionelle Regulation der Akkumulation plastidärer mRNA



C. Translationelle und posttranslationelle Regulation

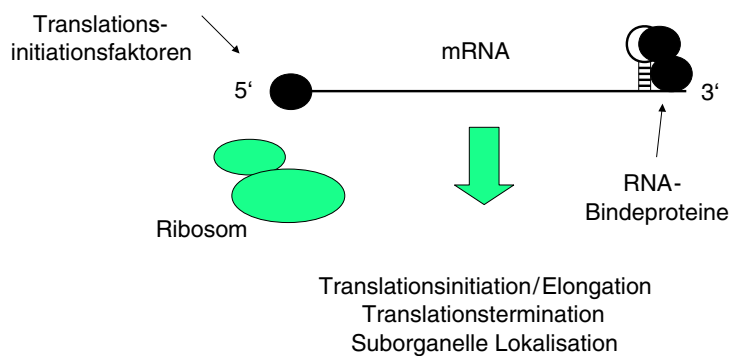


Abbildung 1 Ebenen der Regulation der Genexpression in Plastiden (Abbildung verändert nach Gruissem & Tonkyn (1993), Mayfield et al. (1995), Schuster et al. (1999)).

Transkriptionelle Regulation

Mit der Methodik der „Run on“- Analyse war es erstmals möglich, quantitative Messungen von plastidären Transkriptionsraten durchzuführen (Deng & Gruissem 1987). So zeigte sich eine Varianz in der Expression plastidärer Gene in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium der Plastiden (Krupinska 1992; Krupinska & Falk 1994).

Die Transkription eines Genes kann durch verschiedene Faktoren moduliert werden, z.B. durch die Art der RNA-Polymerase, die es transkribiert. Die plastidären Polymerasen besitzen zudem unterschiedliche Promotoren, die in ihrer Struktur und Bindungsstärke der Polymerase einen Einfluß auf die Transkription von Genen nehmen (s. 1.3.2). *In vitro*-Mutationen oder natürliche Abweichungen des PEP-Promotors in der Basenabfolge und des Abstandes der „-35“ / „-10“-Blöcke bewirken eine Reduktion der Transkription (Bradley & Gatenby 1985; Gruissem et al. 1983; Link 1984). Auch die Topologie der Plastiden-DNA, DNA-Methylierung und Kopienzahl der DNA-Moleküle können die Bindungsfähigkeit der RNA-Polymerasen an den Promotor beeinflussen und auf diese Weise die Transkription regulieren (Stirdivant et al. 1985; Kobayashi et al. 1990; Tiller & Link 1993a; Rapp & Mullet 1991). Regulatorische Proteine, wie die σ -Faktoren der plastidär kodierten Polymerase, spielen eine wichtige Rolle in der Transkription (Allison 2000) (s. 1.3.2). Aber auch entwicklungspezifische Signale bestimmen maßgeblich die Transkriptionsstärke eines Genes, wie im Falle des *psbD/psbC*-Operons, welches für die Proteine D2 und CP43 kodiert (Vermaas & Ikeuchi 1991). An der entwicklungsabhängigen Expression des Operons sind auf Transkriptionsebene mindestens vier verschiedene Promotoren beteiligt, von denen einer mit einer Blaulichtrezeptorsequenz assoziiert ist (Gamble & Mullet 1989; Christopher & Mullet 1994; Christopher 1996). In reifen Plastiden ist die durch Blaulicht induzierte mRNA des *psbD*-Genes vorherrschend (Mullet et al. 1990).

Posttranskriptionelle Regulation

Eine weitaus größere Rolle in der Regulation der Genexpression der Plastiden spielen posttranskriptionelle Mechanismen, wie die Stabilität von Transkripten, Translation, Umsatzraten von Proteinen und spezifische Proteinaktivitäten (Danon 1997; Eibl et al. 1999; Rochaix 1996). Durch verschiedene Abbauraten plastidärer mRNAs besteht meist eine Diskrepanz zwischen dem RNA- und Transkriptionsmuster einer Pflanze (Klaff & Gruissem 1991; Mullet & Klein 1987; Rapp et al. 1992). Abbauraten und Stabilität von mRNAs sind gen- und

gewebespezifisch, licht- und entwicklungsabhängig (Kim et al. 1993). Die Prozessierung von polycistronisch angeordneten Plastidengenomen (Westhoff & Herrmann 1988), mRNA-Edierung (Bock et al. 1996; Kudla et al. 1992; Maier et al. 1996), Spleißen von Transkripten (Barkan 1989) oder die Modulation von Enzymaktivitäten durch Phosphorylierung/Dephosphorylierung (Kruse et al. 1997) und Degradation (Kim et al. 1994) sind weitere Faktoren, die die Genexpression beeinflussen können. Gegenläufige Sequenzwiederholungen im 3' untranslatierten Bereich (3'UTR) können „Stem/Loop“-Formation bilden, die wahrscheinlich eine Rolle in der Bildung des 3'-Endes und der Stabilität der mRNA spielen (Rott et al. 1998; Schuster & Grissem 1991). Die 3'UTR dient als Erkennungssequenz sowohl für Endonukleasen als auch für Proteine, die die mRNA vor dem Abbau durch Endonukleasen schützen. Die Bindung plastidärer mRNA an Ribosomen zur Bildung von ribonukleären Komplexen ist ein weiterer Stabilisierungsmechanismus (Kim et al. 1993; Klaff & Grissem 1991).

Translationelle Regulation

Die plastidäre Translation wird durch ein komplexes Kontrollsystem reguliert, welches eine schnelle Anpassung des Proteinniveaus an äußere Stimuli ermöglicht. Im Gegensatz zur Transkription sind die regulatorischen Sequenzen der Translation in den Plastiden weniger genau untersucht (Zerges 2000). Nukleäre Genprodukte sind essentiell für die Translation aller plastidären Gene (Danon 1997). Viele dieser Proteine binden spezifisch an die 5'-UTR Sequenzen wie die des *psbA*-Genes in Spinat (Alexander et al. 1998). Die Bindung der Proteine wird durch ihren Phosphorylierungsstatus reguliert (Danon & Mayfield 1994). In *Chlamydomonas* wurde ein *psbA*-spezifischer Translationsfaktor, RB47, identifiziert. Dieser Faktor ist essentiell für die Translation des Gens und reguliert diese in Abhängigkeit vom plastidären Redoxzustand sowie von der Lichtqualität und -quantität (Yohn et al. 1998b; Yohn et al. 1998a).

Die Translation in den Plastiden wird durch mindestens zwei verschiedene Mechanismen initiiert. Zum einen durch Bindung an die für Prokaryoten typische *Shine Dalgarno*-Sequenz, typischerweise 5'-GGAGG-3' innerhalb der ersten 20 Nukleotide vor dem Translationsstart, die allerdings nur in 40% aller Plastidengene zu finden ist (Sugiura et al. 1998). Zum anderen binden die Ribosomen an sogenannte *cis*-Elemente, die eine Bindung zwischen der mRNA und der kleinen ribosomalen Untereinheit ermöglichen (Danon 1997; Choquet & Wollman 2002).

1.3.2 Plastidäre RNA-Polymerasen

Für die Transkription in den Plastiden werden mindestens zwei verschiedene DNA-abhängige RNA-Polymerasen verantwortlich gemacht: Eine wird vom Plastom kodiert („plastid encoded polymerase“ = PEP), mindestens eine weitere ist kernkodiert („nuclear encoded polymerase“ = NEP).

Plastomkodierte RNA-Polymerase (PEP)

Die vier Plastidengene *rpoA*, *B*, *C1* und *C2* kodieren für vier der fünf Untereinheiten der PEP, die fünfte Untereinheit, der sogenannte Sigmafaktor („sigma like factor“, SLF), ist kernkodiert und wird posttranslational in die Plastiden importiert (Allison 2000). Aufgrund der hohen Homologie dieser Gene mit den Untereinheiten der bakteriellen RNAP, den α -, β -, β' - und β'' -Untereinheiten, ähnelt diese RNAP damit der RNA-Polymerase von *E. coli* (Hu & Bogorad 1990; Hu et al. 1991; Igloi & Kössel 1992). Die drei Gene *rpoB*, *rpoC1* und *rpoC2* bilden zusammen ein Operon (Hudson et al. 1988), während *rpoA* getrennt davon am Ende des S10/SPC/alpha-Operons liegt (Zhou et al. 1989; Herrmann et al. 1992). Die RNA-Polymerase setzt sich wie folgt zusammen: Die α -Untereinheit bildet wie die α -Untereinheit aus *E. coli* ein Dimer und bindet regulatorische Sequenzen. Diese Untereinheit ist für die Assemblierung der anderen Untereinheiten zum Kern-Enzym wichtig. Die β -Untereinheit ist in *E. coli* und in Plastiden für die Ausbildung der Phosphodiesterbindungen verantwortlich. β' und β'' entsprechen mit N- bzw. C-Terminus der β' -Untereinheit von *E. coli* und binden die DNA-Matrize (Hu & Bogorad 1990; Hu et al. 1991). Sigmafaktoren vervollständigen das Holoenzym und dienen der Erkennung von Promotoren (Surzycki & Shellenbarger 1976; Lerbs et al. 1988; Tiller et al. 1991; Tiller & Link 1993b; Allison 2000). Es sind drei Sigmafaktoren (SigA, SigB, SigC) im Kerngenom von *Arabidopsis thaliana* gefunden worden (The *Arabidopsis* Genome Initiative 2000), die posttranskriptional in die Plastiden importiert werden müssen (Tanaka et al. 1997). Aber auch in *Oryza sativa* und *Sinapis alba* sind mehrere Sigmafaktoren gefunden worden, die eine kleine Genfamilie bilden (Kestermann et al. 1998; Tozawa et al. 1998). Die Notwendigkeit verschiedener Sigmafaktoren dient wahrscheinlich als weiterer Mechanismus, die unterschiedlichen PEP-Promotoren zu regulieren (Hess & Börner 1999).

Die wichtigste Bindungsstelle zwischen Sigmafaktor und dem Grundenzym liegt auf der β'' -Untereinheit (Igloi & Kössel 1992). Die spezifische Promotorerkennung findet über eine mehrstufige Interaktion statt, die die DNA-Bindeeigenschaften des Sigmafaktors beeinflusst (Young et al. 2001; Gruber et al. 2001).

Kernkodierte RNA-Polymerase (NEP)

Erste Hinweise darauf, daß neben der plastomkodierten RNA-Polymerase wenigstens eine kernkodierte RNA-Polymerase Gene des Plastidenchromosoms transkribiert, gaben ribosomendefiziente Plastiden aus *H. vulgare*, in denen Transkriptionsaktivität nachgewiesen werden konnte (Falk et al. 1993; Hess et al. 1993). Diese Defizienz wurde entweder ausgelöst durch Hitzebleichung von Getreidekeimlingen (Bünger & Feierabend 1980) oder durch eine Mutation im Kerngenom wie bei der Gerstenmutante „*albostrians*“ (Siemenroth et al. 1981). Aufgrund der plastidären Ribosomendefizienz kann die PEP in diesen Pflanzen nicht synthetisiert werden. Anhand von Untersuchungen an Tabakmutanten mit deletierten Untereinheiten der plastidenkodierten RNA-Polymerasegene (*rpoA*, *rpoB*, *rpoC1*, *rpoC2*) (Allison et al. 1996; Hajdukiewicz et al. 1997; Serino & Maliga 1998) oder durch gezielte Insertion einer Reportergen-kassette (*aad*) (De Santis-Maciossek et al. 1999; Krause et al. 2000), die auch zu einer Defizienz der plastidär kodierten Polymerase führte, wurde der Hinweis auf die Existenz weiterer RNA-Polymerasen untermauert.

Im Kerngenom verschiedener Höherer Pflanzen wurde das Gen für eine plastidenspezifische RNA-Polymerase gefunden. Diese Polymerase besitzt große Ähnlichkeit mit mitochondrialen RNA-Polymerasen (Hedtke et al. 1997; Young et al. 1998; Chang et al. 1999; Hedtke et al. 1999) sowie mit der RNA-Polymerase von T7- und T3-Bakteriophagen (Masters et al. 1987; Cermakian et al. 1996). Da die Gene dieser Polymerasen im Kern lokalisiert sind, haben sie ein plastidäres Lokalisationssignal und werden nach der Translation im Cytoplasma in die Organellen importiert (Greenleaf et al. 1986; Soura 1996; Temiakov et al. 2000). RNA-Polymerasen vom Bakteriophagen-Typ bestehen nur aus einer Untereinheit und werden in *Arabidopsis thaliana* von den Genen *rpoT;1*, *rpoT;2* und *rpoT;3* kodiert (Börner et al. 1999; Hedtke et al. 2000).

Das Genprodukt von *rpoT;3* wird ausschließlich in die Plastiden importiert, während *rpoT;1* ein mitochondriales Enzym ist (Chang et al. 1999; Ikeda & Gray 1999). Das *rpoT;2*-Produkt dagegen ist sowohl in den Plastiden als auch in den Mitochondrien zu finden. (Hedtke et al. 1997; Hedtke et al. 2000; Kobayashi et al. 2001). Einen Sonderfall stellt die Konstellation nukleär kodierter Polymerasen in Tabak dar. Hier finden sich im Genom jeweils zwei Paare der drei *rpoT*-Gene, die alle exprimiert werden (Hedtke et al. 2002). In monokotylen Pflanzen wie *Triticum aestivum* und *Zea mays* ist *rpoT;2* noch nicht gefunden worden, hier existieren vermutlich nur die beiden organellenspezifischen RNA-Polymerasen *rpoT;1* und *rpoT;3*. Die identifizierten *rpoT*-Gene weisen untereinander einen hohen Grad an Sequenzhomologie und Homologie in bezug auf Zahl und Gren-

zen der Introns auf, weshalb man davon ausgeht, daß sie auf ein gemeinsames Ursprungsgen zurückzuführen sind (Hedtke et al. 2002). Um Einblick in die evolutionäre Entwicklung dieser Genfamilie zu bekommen, wurden die *rpoT*-Gene im Moos untersucht *Physcomitrella patens*, das als Bryophyt mit den ersten Landpflanzen verwandt ist (Richter et al. 2002). Die hohe Sequenzhomologie der beiden *rpoT*-Gene in *P. patens* weist auf den gemeinsamen Ursprung der Genfamilie hin. In *Physcomitrella* werden jedoch die Genprodukte beider Polymerasen sowohl in die Plastiden als auch in die Mitochondrien importiert.

In Spinat wurde eine zusätzliche nukleär kodierte RNA-Polymerase identifiziert, die an der Transkription des rDNA-Operons beteiligt zu sein scheint und keine Ähnlichkeit zur mitochondrialen NEP aufweist (Bligny et al. 2000). Das zugehörige Gen wurde bisher allerdings noch nicht identifiziert.

Modelle von Mullet (1993) und Maliga (1998) gehen davon aus, daß eine entwicklungspezifische Regulation und Genspezifität zwischen den beiden Polymerasen besteht. NEP ist zuständig für die Grundtranskriptionsaktivität in den Plastiden und notwendig für die Aufrechterhaltung der vielfältigen metabolischen Funktionen der Plastiden, wie z.B. die Biosynthese von Aminosäuren, von Fettsäuren und von Phytohormonen (Hess & Börner 1999). In Proplastiden ist diese Polymerase die erste, die plastidäre Gene und somit auch die vier plastomkodierten Untereinheiten der PEP transkribiert. Die PEP ist dagegen in den reifen Chloroplasten aktiv und ist für die starke Expression der Gene verantwortlich, die die Komponenten des Photosyntheseapparates kodieren. Auch die NEP ist in Chloroplasten aktiv und verantwortlich für die Transkription von Genen, die keinen PEP-Promotor besitzen oder zusätzlich durch die PEP transkribiert werden (Allison et al. 1996; Hajdukiewicz et al. 1997; Hübschmann & Börner 1998; Iratni et al. 1997).

Plastidäre Promotoren

Die Existenz mehrerer RNA-Polymerasen in den Plastiden spiegelt sich auch in den Promotorstrukturen plastidärer Gene wieder. Als Promotoren bezeichnet man konservierte DNA-Sequenzen, die im Bereich vor dem Startcodon eines Gens gelegen sind und die Erkennungssequenz für eine Polymerase darstellen.

Die Transkription der plastidär kodierten Polymerase (PEP) (s. 1.3.2) geht von einem Promotor aus, der dem eubakteriellen Promotor von *E.coli* mit einer „-10“ und einer „-35“-Box stark ähnelt (Igloi & Kössel 1992; Hess & Börner 1999; Liere & Maliga 2001). Die Erkennung der PEP-Promotoren findet durch kernkodierte Sigmafaktoren statt (Hakimi et al. 2000; Allison 2000; Privat et al. 2003), deren Expression von entwicklungspezifischen oder lichtabhängigen Si-

gnalen gesteuert wird (Baginsky et al. 1997; Lahiri & Allison 2000). Aber auch Variationen der eubakteriellen „-10“ / „-35“-Promotorstruktur sind bekannt. Der Promotor des *rps16*-Gens besitzt nur eine „-35“-Struktur (Neuhaus et al. 1989). Die Funktion des „-35“-Elements im lichtinduzierten *psbD*-Promotor wird durch die Bindung von Faktoren (AGF, BB) oberhalb der Promotorsequenz übernommen (Kim et al. 1999). Das *rrn16*-Operon wird in Tabak durch PEP von einem σ^{70} -Promotor (PrnP1) aus transkribiert (Vera & Sugiura 1995), wie es auch in vielen anderen Höheren Pflanzen der Fall ist, z.B. in *Zea mays* (Strittmatter et al. 1985), *Lycopersicon esculentum* (Sun et al. 1989), *Oryza sativa* (Silhavy & Maliga 1998), *Hordeum vulgare* (Hübschmann & Börner 1998) und *Arabidopsis thaliana* (Sriraman et al. 1998). Eine hexamere Sequenzabfolge (GTGGGA) unmittelbar oberhalb des „-35“-Elements ist essentiell für die Erkennung dieses Promotors und stark konserviert auch in phylogenetisch verschiedenen Arten. Diese ersetzt die Interaktion des σ -Faktors mit dem „-10“-Element und wird als *rRNA operon upstream activator* („RUA“) bezeichnet (Suzuki et al. 2003).

NEP-spezifische Promotoren (s. 1.3.2) wurden durch Transkriptionsanalysen von PEP-Mutanten identifiziert (Hajdukiewicz et al. 1997; Kapoor et al. 1997). Diese weisen Homologien zu mitochondrialen Promotoren sowie zu Bakteriophagen-Promotoren auf und enthalten als Erkennungssequenz ein „YRTA“-Motiv innerhalb einer konservierten Struktur von 11 Basen (Hajdukiewicz et al. 1997; Kapoor et al. 1997; Miyagi et al. 1998; Silhavy & Maliga 1998; Kapoor & Sugiura 1999; Liere & Maliga 1999). Stromaufwärts gelegene Sequenzen, die ein „GAA“-Motiv (Box II) aufweisen, verstärken die Transkription durch die NEP (Kapoor & Sugiura 1999; Xie & Allison 2002).

Aufgrund der Analyse plastidärer Transkriptenden unterteilt man plastidäre Gene in drei unterschiedliche Klassen. 1. Gene, die PEP-Promotoren besitzen, 2. Gene mit sowohl einem NEP- als auch einem PEP-Promotor und 3. Gene, die ausschließlich von NEP-Promotoren aus transkribiert werden. Von den insgesamt 29 im Plastidenchromosom von Tabak beschriebenen Promotoren gehören 16 zur Klasse der PEP- und 13 zur Klasse der NEP-Promotoren. Gene mit PEP-Promotoren sind *rbcl* (Orozco et al. 1990), *psbA* (Sugita & Sugiura 1984), *rpl32* (Vera et al. 1992), *psaA* (Meng et al. 1988), *rrn16* (Vera & Sugiura 1995), *trnG-UCC*, *psbK* (Meng et al. 1991), *psbD*, *psbC* (Yao et al. 1989), *clpP*, *atpH*, *atpI* (Hajdukiewicz et al. 1997; Miyagi et al. 1998), *atpE* (Kapoor et al. 1994), *trnE* (Ohme et al. 1985) und *atpB* (Kapoor et al. 1997). NEP-Promotoren werden für die Transkription der Gene *rrn16* (Kapoor et al. 1997; Allison et al. 1996), *rpl32* (Vera et al. 1996), *atpB*, *accD*, *ycf2*, *ycf1*, *rps2*, *rpoB*, *rps16* (Hajdukiewicz et al. 1997), *atpI* (Miyagi et al. 1998) und *clpP* (Sriraman et al. 1998) verwendet. Die Transkription der Gene *rrn16*, *atpB* und *rpl32* erfolgt sowohl von einem PEP- als auch von einem NEP-Promotor aus.

Das *rrn16*-Operon bietet ein Beispiel dafür, daß die unterschiedlichen Promotoren keineswegs in allen Pflanzen konserviert sind. In Tabak findet sich zusätzlich zum PEP Promotor ein NEP-Promotor (PrrnP2), von wo aus die Transkription des Gens durch die NEP startet (Vera & Sugiura 1995; Allison et al. 1996). *Spinacea oleracea* besitzt einen weiteren Promotor, Pc, oberhalb des Operons, der als NEP-Promotor identifiziert wurde (Iratni et al. 1997; Bligny et al. 2000). Pc dient auch als ein zweiter Promotor in *A. thaliana* (Sriraman et al. 1998) und *Sinapis alba* (Pfannschmidt & Link 1997).

Zwei unterschiedliche Klassen von NEP-Promotoren in Tabak lassen vermuten, daß diese von unterschiedlichen nukleär kodierten Polymerasen benutzt werden (Kapoor et al. 1997; Liere & Maliga 1999; Sriraman et al. 1998) oder spezifische Faktoren für ihre Erkennung benötigen.

1.4 Parasitische Blütenpflanzen als Modellorganismen für die Analyse der plastidären Genexpression

Parasitische Blütenpflanzen haben aufgrund ihrer extremen Lebensweise Anpassungen auf morphologischer, physiologischer und zellulärer Ebene durchlaufen, die auch das Plastidenchromosom in Form von Gendelektionen betreffen. Diese natürlichen Veränderungen im Kodierungspotential des Plastidenchromosoms und im Aufbau des plastidären Transkriptionsapparates macht sie zu idealen Modellorganismen für die Analyse der plastidären Genexpression.

1.4.1 Lebensweise und Vorkommen parasitischer Blütenpflanzen

Per Definition haben parasitisch lebende Pflanzen die autotrophe Lebensweise teilweise oder ganz aufgegeben und sind ein Abhängigkeitsverhältnis mit einer Wirtspflanze eingegangen, von der sie Wasser und Nährstoffe erhalten. In Anpassung an die parasitische Lebensweise sind Wurzeln, Blätter und Keimblätter zumeist reduziert, dafür hat aber die Ausbildung von Haustorien stattgefunden, die es dem Parasiten ermöglichen, eine Verbindung zu den Wasser- und Nährstoffbahnen der Wirtspflanze herzustellen (Jeschke et al. 1994).

Zwei Unterscheidungsmöglichkeiten teilen die parasitischen Blütenpflanzen in zwei große Gruppen ein. Man unterscheidet anhand der Photosyntheseleistung zwischen Hemi- und Holoparasitismus. Die Ausprägung der Photosyntheseleistung wird jedoch von verschiedenen Autoren unterschiedlich gedeutet.

tet. Kuijt (1991) bezeichnet alle diejenigen Pflanzen als Holoparasiten, die kein Chlorophyll mehr besitzen. Als Hemiparasiten werden diejenigen Pflanzen bezeichnet, in denen Chlorophyll nachweisbar ist. Nach Nickrent et al. (1997) sind hemiparasitisch lebende Pflanzen fakultativ an die parasitische Lebensweise angepaßt und können z.B. einen Teil ihres Lebenszyklus ohne die Wirtspflanze überleben. Ihre Photosyntheseleistung ist ausreichend für eine autotrophe Ernährung. Holoparasiten können auch Photosynthese betreiben, die Photosyntheseleistung übersteigt jedoch nicht den Kompensationspunkt. Die Pflanzen sind bereits unmittelbar nach der Keimung abhängig von ihrer Wirtspflanze sowohl im Hinblick auf Wasser- als auch auf Nahrungszufuhr. Je nach ihrem Ansatzpunkt auf der Wirtspflanze können Parasiten in Sproß- und Wurzelparasiten eingeteilt werden (Musselmann & Press 1995).

Parasitismus bei Pflanzen läßt sich nicht nur einer Pflanzengruppe zuordnen, sondern ist in sehr vielen verschiedenen Pflanzenordnungen und -familien zu finden. Es wird angenommen, daß diese Lebensweise in der Evolution der Angiospermen mindestens achtmal entstanden ist (Musselmann & Press 1995). Abbildung 2 gibt einen Überblick über die größten Ordnungen und Pflanzenfamilien, in denen parasitisch lebende Pflanzen zu finden sind und gibt Auskunft über ihre phylogenetische Beziehung zueinander. Parasitische Blütenpflanzen sind ausschließlich unter den dikotylen Angiospermen zu finden. Hier kommen sie in den Familien *Santalaceae*, *Lauraceae*, *Loranthaceae*, *Orobanchaceae*, *Cuscutaceae*, *Scrophulariaceae*, *Raflesiaceae* und *Balanophoraceae* vor (Kuijt 1969) und umfassen mit ungefähr 3000 Arten ca. 1% der Blütenpflanzen. Die Angaben für die phylogenetischen Verwandtschaftsverhältnisse beruhen auf Sequenzanalysen des *rbcL*-Genes und der kernkodierten *ssrDNA* sowie morphologischer Merkmale der Pflanzen. Unsicherheiten in der systematischen Zuordnung parasitischer Pflanzen beruhen zum einen auf dem Fehlen morphologischer Merkmale durch extreme Reduktion des Aufbaus, zum anderen auf der hohen Mutationsrate der Gensequenzen, die eine phylogenetische Einordnung erschwert.

1.4.2 Die Gattung *Cuscuta*

Die Gattung *Cuscuta* umfaßt ungefähr 150 ausschließlich parasitisch lebende Arten, die auf dem Stamm- oder Stengelgewebe anderer Angiospermen parasitieren. Im Laufe der Evolution haben sich die Arten in einem unterschiedlichen Grad an die parasitische Lebensweise angepaßt. Augenscheinlich wird dies im Habitus der Pflanzen, der Ultrastruktur und der physiologischen Fähigkeiten ausgebildet (Machado & Zetsche 1990; van der Kooji et al. 2000; Krause et al.

1 Einleitung

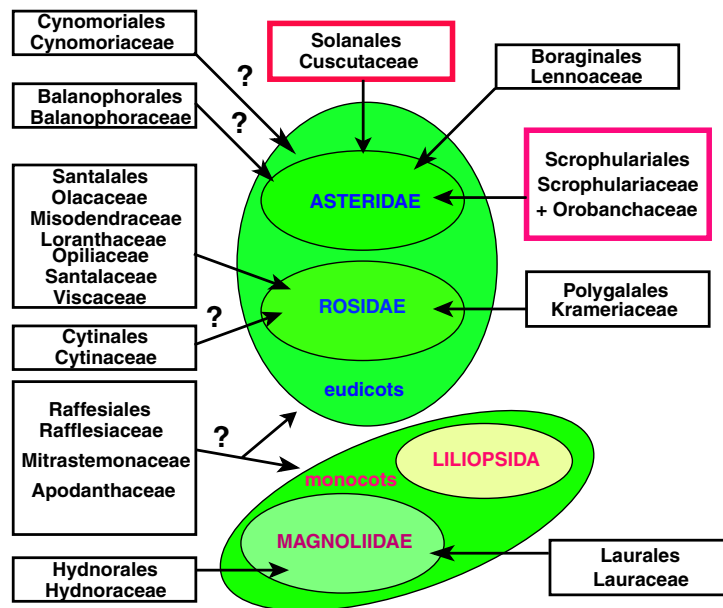


Abbildung 2 Gruppen der Pflanzenfamilien, die parasitisch lebende Pflanzen enthalten. Zwei Gruppen, Scrophulariales und Solanales (rot umrandet), enthalten die Pflanzenfamilien Scrophulariaceae, Orobanchaceae und Cuscutaceae. Arten dieser Pflanzenfamilien dienten als Untersuchungsobjekte für die Auswirkungen einer parasitischen Lebensweise auf den Gengehalt des Plastidenchromosoms. Unsicherheiten in der Zuordnung der Ordnungen sind durch Fragezeichen an den Zuordnungspfeilen gekennzeichnet (Nickrent & Starr 1994; Nickrent & Soltis 1995). Quelle: <http://www.science.siu.edu/parasitic-plants/Relation-Flowering.html>, 05/2003.

2003) (Abb. 3). Alle Arten weisen den Verlust von Blättern und die Umbildung der Wurzeln zu Haustorien auf (Jeschke et al. 1994; Dörr 1987; Dörr 1990). Sowohl Wasser als auch Nährstoffe werden komplett über die Wirtspflanze aufgenommen (Dawson et al. 1994).

Neben chlorophyllhaltigen, photosynthetisch aktiven Arten, wie z.B. *Cuscuta reflexa* und *Cuscuta gronovii*, finden sich in der Gattung auch chlorophylllose, photosynthetisch inaktive Arten wie *Cuscuta odorata* (Panda & Choudhury 1992; Dawson et al. 1994; van der Kooji et al. 2000) (Abb. 3). Die Photosyntheserate überschreitet selbst in der grünen Art *C. reflexa* nicht den Kompensationspunkt. *C. reflexa* fixiert jedoch kleine Mengen an CO₂ (Hibberd et al. 1998). Charakteristisch für alle Arten ist ein hoher Gehalt an Carotinoiden, auch in den chlorophylllosen Arten (Abb. 3). Ultrastrukturelle Untersuchungen ergaben,

1 Einleitung

daß *C. reflexa* annähernd normale Chloroplasten mit Grana- und Stromathylakoiden enthält (s. 1.1), während diese Strukturen in *C. gronovii* weniger ausgeprägt sind. Den Plastiden von *C. odorata* fehlen Thylakoidstrukturen. Stattdessen sind die Plastiden von unregelmäßiger Struktur und enthalten irreguläre Tubuli und Vesikel (van der Kooji et al. 2000) (Abb. 3).

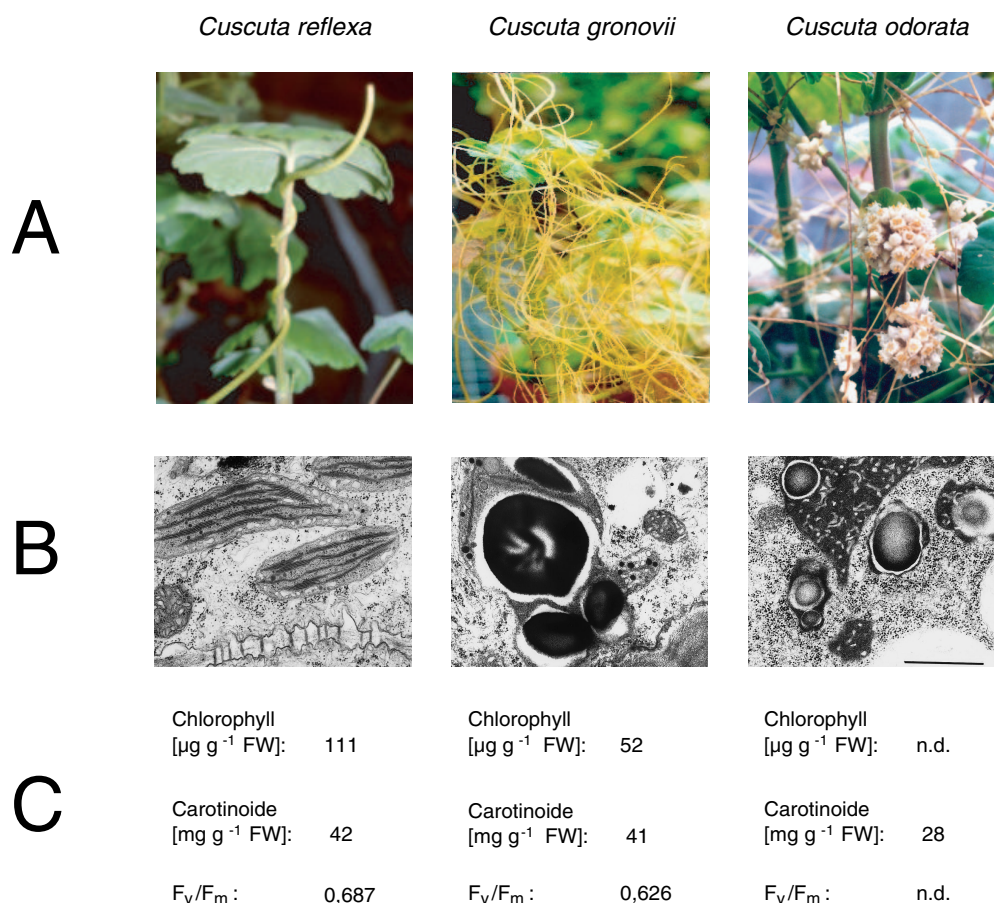


Abbildung 3 (A) Habitus, (B) elektronenmikroskopische Aufnahme der Plastiden, Balken = $1\ \mu\text{m}$ und (C) Chlorophyllgehalt, Carotinoidgehalt und F_V/F_M -Werte der untersuchten *Cuscuta*-Arten *C. reflexa*, *C. gronovii* und *C. odorata*. Fotos von S. Berg und K. Krause (A), van der Kooji et al. (2000) (B,C).

1.4.3 Evolution des Plastidengenoms in Holoparasiten

Holoparasitisch lebende Pflanzen sind in ihrer Ernährungsweise vollkommen abhängig von der Kohlenstoffzufuhr durch die Wirtspflanze, auf der sie leben. Der evolutionäre Druck, die plastomkodierte Photosynthese zu erhalten, entfällt. In der Photosyntheserate reduzierte oder photosynthetisch inaktive Parasitenpflanzen sind somit ein exzellentes Objekt, um die Auswirkungen der parasitischen Lebensweise auf die Evolution des Plastidengenoms zu erforschen (s. 1.2).

Der Verlust der Photosynthesefähigkeit hat eine teilweise oder vollständige Eliminierung von plastomkodierten Photosynthesegenen in verschiedenen Pflanzenarten zur Folge (DePamphilis & Palmer 1990; Wolfe et al. 1992a; Thaluarn et al. 1994; Delavault et al. 1996). Die parasitisch lebende Orobanche *Epifagus virginiana*, die mit 71 kb das am stärksten reduzierte bisher bekannte Plastidengenom besitzt, weist keinerlei Photosyntheseaktivität mehr auf (DePamphilis & Palmer 1990). Alle Gene der Photosynthese und Chloroatmung fehlen in *E. virginiana*. Von den 42 verbliebenen Genen kodieren 38 Gene für Komponenten des Genexpressionsapparates der Plastiden (Wolfe et al. 1992b). Den vier Proteingenen *ycf1*, *ycf2*, *clpP* und *accD* wird eine essentielle Funktion für den Erhalt der Plastiden zugesprochen. Neben dem Verlust der Untereinheiten der plastidär kodierten Polymerase fällt das Fehlen ribosomaler Gene und vieler tRNAs auf. Da Genexpression in den Plastiden stattfindet (DePamphilis & Palmer 1990), müssen kernkodierte tRNAs, die auf einem bisher unbekanntem Importweg in die Plastiden gelangen, diese Funktion übernehmen (Wolfe et al. 1992b).

Gendelektionen im Plastidengenom sind auch bei *C. reflexa* (Haberhausen et al. 1992; Bömmner et al. 1993; Haberhausen & Zetsche 1994), *Conopholis americana* (Wimpee et al. 1991) und *Orobanche hederarum* (Thaluarn et al. 1994) dokumentiert. Für das Genom der Plastiden von *C. reflexa* unterscheiden Haberhausen & Zetsche (1994) vier Stufen der Veränderung gegenüber dem Plastidengenom autotropher Pflanzen:

1. Sequenzabweichungen in kodierenden Bereichen, z.B. von *psbA*, die keine Auswirkungen auf die Transkriptakkumulation haben (Bömmner et al. 1993),
2. Gene mit Änderungen in den regulatorischen Bereichen, z.B. im Promotor und in nichttranskribierten Bereichen (UTR = untranscribed region), die zu einer Verringerung der Transkription bzw. Transkriptakkumulation führen (Haberhausen et al. 1992),
3. Pseudogene ohne nachweisbare Expression, z.B. *ndhB* (Haberhausen et al. 1992),

4. Deletionen, die mehrere Gene betreffen, z.B. zwei Gene für ribosomale Proteine und tRNAs (Bömmmer et al. 1993).

Interessant ist außerdem das Fehlen aller plastidär kodierten *ndh*-Gene in *C. reflexa* (Haberhausen & Zetsche 1994), die in autotrophen Pflanzen eine Rolle bei der plastidären Chlororespiration spielen könnten (Bennoun 1982; Bandall & Manasse 1995; Burrows et al. 1998). Der NADH-Dehydrogenase-Komplex, dessen Gene (*ndhA-K*) in ihrer Proteinsequenz den Komponenten der mitochondrialen NADH-Dehydrogenase ähneln, ist in Höheren Pflanzen normalerweise stark konserviert. Allerdings fehlen auch auf dem Plastidenchromosom von *Pinus thunbergii* funktionelle *ndh*-Sequenzen (Wakasugi et al. 1994).

1.4.4 Plastidäre Transkription in parasitisch lebenden Pflanzen

Beim Übergang von der autotrophen zur heterotrophen Lebensweise ist es vielfach zum Verlust der *rpo*-Untereinheiten gekommen. Zumeist ist es das *rpoA*-Gen, welches bevorzugt verändert oder deletiert wird. Das *rpoA*-Gen fehlt in dem Holoparasiten *Orobanche hederæ* (Delavault & Thalouarn 1994), sowie in *Euglena gracilis*, einem fakultativ autotrophen Organismus, und in *Plasmodium falciparum*, einem damit verwandten parasitierenden Flagellaten (Stoebe et al. 1998). Die Plastiden dieser Pflanzen erwiesen sich dennoch als transkriptionsaktiv, wie „Northern“- und „Western“-Blot-Analysen zeigen konnten (Morden et al. 1991; Thalouarn et al. 1989; Wimpee et al. 1992; Ems et al. 1995; Freyer et al. 1995; van der Kooji et al. 2000; Krause et al. 2003).

Die photosynthetisch aktive Art *C. reflexa* besitzt, ähnlich wie nicht parasitisch lebende Pflanzen, sowohl eine plastidenkodierte RNA-Polymerase als auch mindestens eine kernkodierte (s. 1.3.2, 1.3.2). Da *C. reflexa* chlorophyllhaltig ist und Photosynthese betreiben kann, stimmt dies mit der Annahme überein, daß Photosynthesegene durch die PEP transkribiert werden. Bei einigen intermediären *C.*-Arten, wie z.B. *C. gronovii* und *C. subinclusa*, wurde trotz der Fähigkeit, Photosynthese auf einem sehr niedrigen Niveau zu betreiben, ein Verlust der *rpo*-Gene beobachtet. Dieser Befund steht im Gegensatz zu der Beobachtung an PEP-defizienten Tabakmutanten oder ribosomendefizienten Gerstenpflanzen, bei denen eine Transkription alleine durch NEP zur Ausbildung eines funktionellen Photosyntheseapparates nicht ausreicht (Abb. 4) (Falk et al. 1993; Hess et al. 1993).

In parasitisch lebenden Pflanzen, denen durch Deletion der Untereinheiten der PEP diese Polymerase fehlt, wird die Transkription durch die NEP übernommen (Krause et al. 2003). In drei *Cuscuta*-Arten wurde die Entstehung eines neuen NEP-Promotors als Ersatz für den ursprünglichen PEP-Promotor bei

1 Einleitung

dem *16SrRNA*-Gen dokumentiert (Krause et al. 2003). In der Parasitenpflanze *Lathraea clandestina* liegt im Fall des *rbcL*-Gens eine ähnliche Situation vor. Hier beginnt die Transkription nicht am PEP-Promotor wie in autotrophen Pflanzen, sondern erfolgt von einer Sequenz aus, die oberhalb dieses Promotors liegt (Lusson et al. 1998).

Parasitische Blütenpflanzen der Gattung *Cuscuta* mit natürlichen Deletionen der *rpo*-Gene (Krause et al. 2003) können im Gegensatz zu den bisher beschriebenen PEP-defizienten Gerste- und Tabakpflanzen ergrünen und sind zur Photosynthese fähig (Abb. 4). Dies macht sie zu idealen Modellorganismen für die Analyse der plastidären RNA-Polymerasen, ihrer Funktion und Regulation.

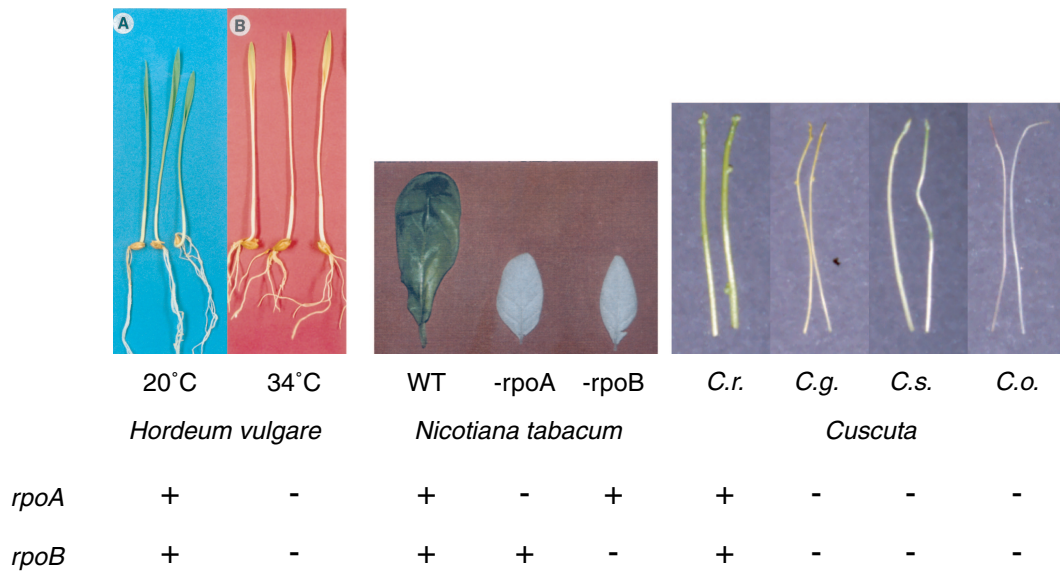


Abbildung 4 Bei 20°C und 34°C angezogene Gerstenpflanzen, Blätter des *N. tabacum*-Wildtyps und der $\Delta rpoA$ - und $\Delta rpoB$ -Mutanten sowie Stengelsegmente der Arten *C. reflexa*, *C. gronovii*, *C. subinclusa* und *C. odorata*. Fotos: J. Falk, K. Krause.

2 Zielsetzung

Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht die Analyse der plastidären Genexpression am Beispiel der holoparasitisch lebenden Blütenpflanzengattung *Cuscuta*. Die Untersuchungen werden an der grünen, photosynthetisch aktiven Art *C. reflexa*, der intermediären Art *C. gronovii* und der weißen Art *C. odorata* durchgeführt. Als Grundlage für die Untersuchung der plastidären Genexpression dient die Bestimmung des Kodierungspotentials der Plastidenchromosome. Große Fragmente des Plastidenchromosoms von *C. reflexa* sind hierzu in pBSC zu klonieren und eventuelle Lücken in der Sequenz durch überlappende PCR-Fragmente zu schließen. Die Sequenz des Plastidenchromosoms ist mit der Sequenz der nicht-parasitisch lebenden Pflanze *N. tabacum* zu vergleichen. Anhand von vergleichenden *Southern Blot*-Analysen, in denen das gesamte Plastidenchromosom von *N. tabacum* als Referenz dient und auf einem Filter immobilisiert wird, ist das Kodierungspotential weiterer *Cuscuta*-Arten abzuschätzen.

Einige intermediäre Arten der holoparasitischen Gattung *Cuscuta* stellen ein natürliches Deletionssystem in Bezug auf die *rpo*-Untereinheiten dar (Krause et al. 2003). Im Gegensatz zu den künstlichen Plastommutanten sind diese Pflanzen jedoch in der Lage, zu ergrünen und Photosynthese zu betreiben (van der Kooji et al. 2000). Da bisher noch nicht bekannt ist, wie diese Pflanzen ergrünen können, ist die Analyse der NEP-basierten plastidären Genexpression in einigen *Cuscuta*-Arten einer der zentralen Punkte dieser Arbeit. Am Beispiel des Photosynthesegens *rbcL*, welches in nicht-parasitisch lebenden Pflanzen von einem PEP-Promotor aus transkribiert wird, werden die spezifischen Transkriptionsstarts in verschiedenen *Cuscuta*-Arten untersucht. Hierzu wird die Technik der *Primer-Extension-Analyse* eingesetzt.

Posttranskriptionelle Regulationsmechanismen, wie die Stabilität oder die Degradation von Transkripten, spielen eine bedeutende Rolle in der Regulation der plastidären Genexpression (Gruissem & Tonkyn 1993; Mayfield et al. 1995; Schuster et al. 1999). Um die Bedeutung dieser Mechanismen in der Genexpression von holoparasitischen Pflanzen zu analysieren, sind die RNA-Muster verschiedener *Cuscuta*-Arten zu untersuchen. Um die RNA-Muster miteinan-

2 Zielsetzung

der zu vergleichen, wird die Gesamt-RNA der drei *Cuscuta*-Arten mit einem Filter, auf dem das gesamte Plastidenchromosom von Tabak immobilisiert ist, hybridisiert. Anhand ausgewählter Plastidengene, die als *In vitro*-Transkripte auf einem „Dot blot“-Filter immobilisiert werden, sollen Aussagen über die Transkriptstabilität einzelner Bereiche des Plastidenchromosoms gemacht werden. Um Aufschluß über das Transkriptionsmuster der grünen Art *C. reflexa* zu bekommen, werden „Run on“-Analysen mit isolierten Plastiden dieser Pflanze und eine anschließende Hybridisierung der Transkripte mit den verwendeten „Dot blot“- und Gesamtplastomfiltern durchgeführt.

3 Material und Methoden

3.1 Pflanzenmaterial

Alle *Cuscuta*-Arten wurden auf *Pelargonium zonale* als Wirtspflanze in Gewächshäusern des Botanischen Gartens der Universität Kiel angezogen. Die Pflanzen wurden einem Tag-Nacht-Rhythmus mit gleichzeitigem Temperaturwechsel von 22°C zu 18°C unterzogen. Die 14-stündige Lichtphase hatte eine durchschnittliche Lichtstärke von $130 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ mit einer Wellenlänge von 400 bis 700 nm.

3.2 Chemikalien und Enzyme

Die verwendeten Laborchemikalien wurden von den Firmen Fisher Scientific (Düsseldorf), Invitrogen (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe) und Sigma (München) bezogen und waren, soweit nicht anders angegeben, von reiner Qualität. Die radioaktiv markierten Nukleotide $\alpha^{32}\text{P}$ -pCp und $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP (jeweils 3000 Ci/mmol) waren Produkte der Firma Hartmann Analytic (Braunschweig).

Enzyme für die Modifikation von Nukleinsäuren stammten von den Firmen Fermentas (St. Leon-Rot) und Invitrogen (Karlsruhe).

3.3 Vektoren und Bakterienstämme

Zur Klonierung von plastidären Genfragmenten wurde der Klonierungsvektor pBluescript SK⁺ (Stratagene, LaJolla, Ca. USA) verwendet. Für die Klonierung von PCR-Fragmenten wurde der Vektor pGEM-T der Firma Promega (Mannheim) benutzt. Die rekombinanten Plasmide wurden in Zellen des Stammes DH5 α , einem Derivat des *E.coli*-Stammes KIZ transformiert und vermehrt.

3.4 Plastidengenomklone und Oligonukleotide

Die für die DNA- und RNA-Analysen der verschiedenen *Cuscuta*-Arten verwendeten *Bam*HI-Fragmente der Tabak-plDNA waren in pBR322 kloniert und sind von Sugiura et al. (1986) beschrieben worden (Tab. 2). Ein von diesen Klonen nicht repräsentierter Abschnitt der Plastiden-DNA wurde mit Hilfe folgender Oligonukleotide durch PCR amplifiziert:

5'-ATTCAACCTCTTGCTTG-3' (Position 113071–113055 des Tabakplastoms)

5'-ACTGCGGTGACGATACTG-3' (Position 109663–109680 des Tabakplastoms)

Abbildung 5 gibt einen Überblick über die Lage der Klone auf dem Plastidenchromosom von *N. tabacum*.

Tabelle 2 Liste der in dieser Arbeit verwendeten *Bam*HI-Fragmente der Tabak-plDNA

Klon	Fragmentgröße	repräsentierte Gene (u.a.)
Ba1	19,6 kb	<i>petA; psbF-trnP; rpl33, 18, 20; psbB-petD; rpoA-rpl14</i>
Ba2	19,1 kb	<i>ndhF; ndhD; psaC; ndhE, G, I, A, H; rps15</i>
Ba5	7,1 kb	<i>trnI; rrn23; rrn4,5; rrn5; trnR; trnN</i>
B7	10,9 kb	<i>rpoB, C1, C2</i>
B13	10,4 kb	<i>rpl16; rps3; rpl22; rps19; rpl2, 23; trnI</i>
B18	9,9 kb	<i>trnL; ndhB; rps7, 12; trnV; rrn16; trnI</i>
B19	12,3 kb	<i>trnS; rps4; trnT, L, F, V, M; atpB,E</i>
B20	17,3 kb	<i>trnE, Y, D; psbC, D; trnfM; rps14; psaA,B</i>
B22	4,8 kb	<i>accD, psaI</i>
B25	16,0 kb	<i>trnK; matK, trnS, G, R; atpA, F, I; rps2</i>
B27	7,0 kb	<i>trnV, M; atpB, E; rbcL; accD</i>
B28	7,3 kb	<i>trnH; psbA; trnK, I; rpl2</i>
B29	3,4 kb	<i>atpB; rbcL</i>

Die in der Arbeit verwendeten Oligonukleotide, die in Polymerase-Kettenreaktionen (s. 3.7.2), in *Primer-Extension*-Reaktionen (s. 3.14.1) und für die Sequenzierung des Plastidengenoms (s. 3.13.1) von *C. reflexa* verwendet wurden, wurden von den Firmen MWG (Ebersberg) und Sigma-Ark (Steinheim) bezogen. Ein großer Teil der Oligonukleotide wurde von der Arbeitsgruppe von Prof. Herrmann (LMU, München) zur Verfügung gestellt. Eine Tabelle der verwendeten Oligonukleotide befindet sich im Anhang (s. A.2).

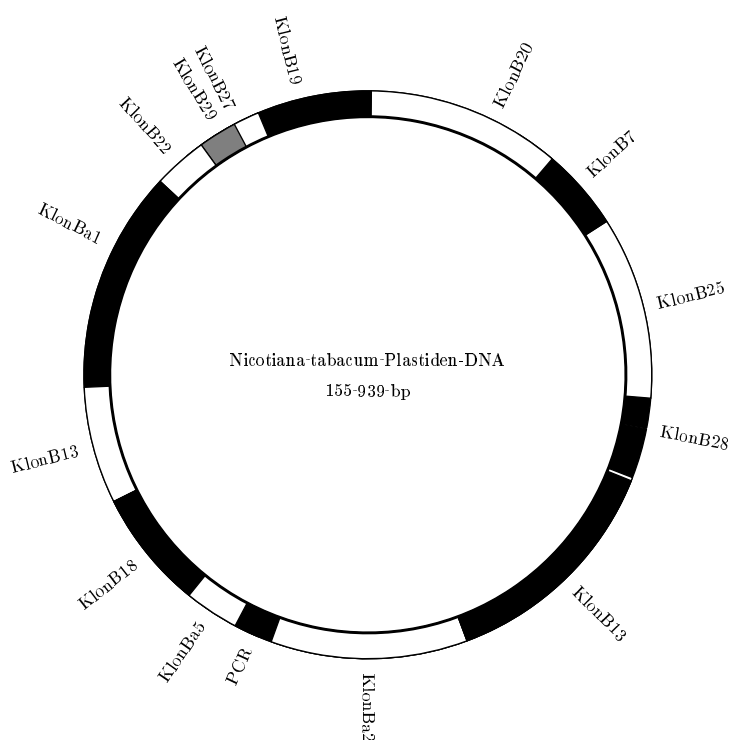


Abbildung 5 Verteilung der in dieser Arbeit verwendeten *Bam*HI-Fragmente auf dem Plastidchromosom von *N. tabacum*. Der Klon B29 (grau gekennzeichnet) ist ein Subklon des Klons B27.

3.5 Stammlösungen

Die folgenden Stammlösungen nach Sambrook et al. (1989) wurden in verschiedenen Experimenten verwendet und sind dort nicht mehr gesondert aufgelistet.

DEPC-H₂O deionisiertes H₂O wurde mit DEPC im Verhältnis von 1:1000 gemischt, ü.N. bei Raumtemperatur stehen gelassen und autoklaviert.

EDTA (0,5 M) Zur Herstellung wurden 181,1 g Dinatriummethyldiamintetraacetat × 2 H₂O in 800 ml demineralisiertem H₂O gelöst, der pH-Wert mit etwa 20 g NaOH oder konzentrierter NaOH auf 8,0 eingestellt, das Volumen auf 1000 ml aufgefüllt und autoklaviert.

Na-Acetat (3 M) Zur Herstellung wurden 408,1 g Na-Acetat × 3 H₂O in 800 ml demineralisiertem H₂O gelöst, der pH-Wert mit Eisessig auf 4,8 eingestellt, das Volumen auf 1000 ml aufgefüllt und autoklaviert.

1 M Tris/HCl Zur Herstellung wurden 121,1 g Tris u.p. in 800 ml bidest. H₂O gelöst, der pH-Wert mit konzentrierter HCl auf den gewünschten Wert zwischen 7,2 und 9,0 eingestellt, das Volumen auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert.

20 × SSC 3 M NaCl und 0,3 M Natriumcitrat wurden in H₂O gelöst und der pH-Wert auf 7,0 eingestellt.

10 × SSPE 3,6 M NaCl, 0,2 M Na₂HPO₄·7H₂O und 20 mM EDTA wurden in H₂O gelöst.

TE 10 mM Tris/HCl und 1 mM EDTA wurden in H₂O gelöst und der pH-Wert auf 8,0 eingestellt.

Alle folgenden Prozentangaben sind Volumenprozent.

3.6 Allgemeine Methoden zum Arbeiten mit Nukleinsäuren

3.6.1 Phenolextraktion

Die Extraktion mit Phenol und Chloroform ist eine Standardmethode zur Entfernung von Proteinen aus Nukleinsäurepräparationen. Die DNA- bzw. RNA-haltige Lösung wird dabei 2 × mit 0,5 Vol. Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1, v/v) und 1 × mit 0,25 Vol. Chloroform/Isoamylalkohol (24:1, v/v) extrahiert. Die sich jeweils in der wässrigen Phase befindlichen Nukleinsäuren können weiterverwendet werden.

3.6.2 Präzipitation von Nukleinsäuren

Die Konzentration der Kationen in der DNA- bzw. RNA-Lösung wurde mit einer der angegebenen Salzlösungen eingestellt.

DNA-Lösung	3 M Natriumacetat pH 4,8	Endkonzentration 0,3 M
RNA-Lösung	5 M Ammoniumacetat	Endkonzentration 2,0 M

Die DNA-Proben wurden mit dem 2,2-fachen, die RNA-Proben mit dem 2,5-fachen Volumen eiskaltem Ethanol (100 %) versetzt und gemischt. Die Präzipitation erfolgte für 30 Minuten bei -80°C oder ü.N. bei -20°C . Die Nukleinsäuren wurden durch 10-minütige Zentrifugation bei $11000 \times g$ sedimentiert und

der Überstand verworfen. Anschließend wurde das Nukleinsäuresediment mit 500 μl eiskaltem Ethanol (70 %) und einer erneuten 5-minütigen Zentrifugation bei $11000 \times g$ gewaschen. Der Überstand wurde verworfen und das Nukleinsäure-Sediment für 3 Minuten in der Vakuum-Zentrifuge getrocknet. Anschließend wurde das Sediment in dem gewünschten Volumen an Wasser aufgenommen.

3.6.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Quantifizierung von Oligo- und Polynukleotiden erfolgte in der Regel photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm gegen H_2O in Quarzküvetten. Eine Extinktion von 1 entspricht Konzentrationen von:

50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ doppelsträngiger DNA
40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ einzelsträngiger DNA
31 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Oligonukleotide
40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNA

Alternativ kann die Konzentration einer DNA-haltigen Lösung anhand der Ethidiumbromid-Fluoreszenz im Agarosegel abgeschätzt werden. Dazu wird die Fluoreszenzintensität der unbekanntes Nukleinsäure-Probe und eines Standards mit bekannten Nukleinsäurekonzentrationen auf einem UV-Transilluminator verglichen und die DNA-Konzentration der Probe abgeschätzt.

3.7 Klonierung von DNA-Fragmenten

Die Klonierung eines bestimmten DNA-Fragments erfordert eine Reihe von Klonierungsschritten. Das gewünschte Fragment wird zunächst durch Restriktion eines Vektors, der das Fragment enthält, oder mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion angereichert. Ein Zielvektor, der das Fragment aufnehmen soll, wird passend präpariert und der Vektor mit dem DNA-Fragment ligiert. Die einzelnen Schritte sind im Folgenden im Detail aufgeführt.

3.7.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die sequenzspezifische Spaltung von DNA-Molekülen wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt, wobei das Volumen des Restriktionsenzym unter 10 % des Gesamtvolumens liegen sollte. Die Konzentration des aktivitätshem-

menden Glycerins, welches den Enzymen zur Stabilisierung kommerziell hinzugesetzt wird, wurde damit möglichst gering gehalten.

3.7.2 DNA-Amplifikation durch Polymerase-Kettenreaktion

Mit der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) lassen sich geringste Mengen von DNA-Fragmenten durch spezifisch gewählte Oligonukleotide tausend- bis millionenfach vervielfältigen (Saiki et al. 1986; Saiki et al. 1988). Die DNA wird dazu zunächst bei 94°C denaturiert. Die anschließenden, sich 30–35mal wiederholenden Zyklen bestehen aus der Bindung der Primer bei einer Temperatur zwischen 50 und 60°C (je nach Beschaffenheit der Primer), einer DNA-Synthese mit einer thermostabilen DNA-Polymerase bei 72°C und einer erneuten Denaturierung bei 94°C. Das folgende Schema verdeutlicht den Ablauf eines PCR-Programmes:

PCR-Schritt	Zeit	Temperatur	Wdh.
Denaturierung	5 Min.	95°C	
Denaturierung	1 Min.	95°C	} 30–35 ×
Primer-Bindung	30 Sek.	50–60°C	
DNA-Synthese	1–10 Min.	68–72°C	
DNA-Synthese	5 Min.	68–72°C	

Ein typischer Reaktionsansatz mit einem Gesamtvolumen von 100 µl bestand aus den folgenden Komponenten:

10-100 ng DNA
 10 µl 10 × PCR-Puffer
 0,4 µl dNTPs (jeweils 25 mM)
 4 µl MgCl₂ (50 mM)
 20 pmol Primer A
 20 pmol Primer B
 0,5 µl Taq-Polymerase (5U/ µl)
 H₂O ad 100 µl

Die Komponenten des Reaktionsansatzes wurden gemischt und die Reaktion in einem Thermocycler von Hybaid (MWG Biotech, Ebersberg) durchgeführt.

3.7.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel erfolgte nach Ausschneiden des gewünschten Fragments unter UV-Licht. Die Extraktion der DNA

erfolgte durch die Bindung an ein Silikaharz (Machery & Nagel, Düren) und anschließende Elution im Nidrigsalz-Puffer oder H₂O bei 50°C nach Angaben des Herstellers.

3.7.4 Isolierung von Vektor-DNA

Die Isolierung von Vektor-DNA beruhte zum größten Teil auf der Methode von Birnboim & Doly (1979) und wurde nach einem modifizierten Protokoll von Ausubel et al. (1994–96), durchgeführt, das den Verdau der RNA mittels der RNase A einschließt. Wurden größere Mengen Plasmid-DNA extrahiert oder wurde besonders reine DNA für die Sequenzierung benötigt, so wurde die Plasmid-Präparation mit DNA-bindenden Säulen von Qiagen (Hilden) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Isolierung beruht auf der Anleitung von Birnboim & Doly (1979), kombiniert mit Säulen, die mit Anionenaustauscher-Harz gefüllt sind, an die die DNA spezifisch bindet.

3.7.5 Dephosphorylierung von Vektor-DNA

Um eine Autoligation von linearisierter Vektor-DNA zu unterbinden, wurde der Vektor mit der Alkalischen Phosphatase aus Kälberdarm (CIAP, *Calf intestine alkaline phosphatase*, Fermentas, Ebersberg) dephosphoryliert. Die Alkalische Phosphatase wurde nach den Angaben des Herstellers verwendet und durch Aufreinigung des Vektors über ein Agarosegel (s. 3.7.3) entfernt.

3.7.6 Ligation von Nukleinsäuren

Der dephosphorylierte, linearisierte Vektor und die zu klonierenden DNA-Fragmente wurden in einem Molverhältnis von 1:3 in die Ligationreaktion eingesetzt. Die Ligation erfolgte nach Zugabe von 1 Weiss Unit T4-DNA-Ligase (Fermentas, Ebersberg) für 12–14 Stunden bei 16°C nach den Angaben des Herstellers.

3.7.7 Klonierung von PCR-Produkten

Für die Klonierung von PCR-Produkten (s. 3.7.2) wurde der durch die Taq-Polymerase produzierte Überhang eines einzelnen Adenosins benutzt. Der kommerziell erwerbliche, linearisierte Klonierungsvektor pGEM-T System I (Promega, Mannheim) besitzt an seinen Enden jeweils einen 3'-Thymidin-Überhang,

ist somit gegengleich zu den Enden eines PCR-Produktes und kann effizient mit diesem ligiert werden. Die Ligation erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

3.8 Anzucht, Transformation und Lagerung von Bakterien

3.8.1 Herstellung von kompetenten Bakterien

LB-Medium

- 1 % Trypton
- 0,5 % Hefeextrakt
- 1 % NaCl

Für die Herstellung kompetenter DH5 α -Zellen wurden 5 ml LB-Medium aus einer Gefrierkultur mit DH5 α -Zellen angeimpft und für mindestens 12 Stunden bei 37°C im Schüttler inkubiert. 1 l LB-Medium wurde mit der Übernachtskultur angeimpft und im Schüttler bei 37°C bis zu einer optischen Dichte von 0,6 bei 450 nm angezogen. Die Flüssigkultur wurde auf sterile Zentrifugenbecher verteilt und für 45 Minuten unter leichtem Schütteln auf Eis abgekühlt. Die Kulturen wurden bei 5000 upm und 4°C für 10 Minuten abzentrifugiert und der Überstand vorsichtig dekantiert. Das Bakteriensediment wurde in 200 ml kaltem und sterilen 0,1 M MgCl₂ resuspendiert und nochmals bei 5000 upm und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Das Bakteriensediment wurde in 200 ml 0,1 M CaCl₂ resuspendiert und für 30 Minuten auf Eis vorsichtig geschüttelt. Nach einer Zentrifugation bei 5000 upm und 4°C für 5 Minuten wurde das Sediment in einer Lösung aus 43 ml CaCl₂ und 7 ml sterilem Glycerin resuspendiert, die Bakterienlösung in 100 μ l-Mengen aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Zellen wurden bis zum Gebrauch bei -80°C gelagert.

3.8.2 Anzucht, Transformation und Lagerung von *E.coli* Kulturen

TCM-Puffer

- 10 mM Tris/HCl (pH7,5)
- 10 mM CaCl₂
- 10 mM MgCl₂

Indikatorplatten

- 1,5 % Agar
- 50 μ g/ml Ampicillin
- 10 μ g/ml IPTG
- 40 μ g/ml X-Gal
in LB-Medium

Zur Transformation wurden 100 μl einer Suspension kompetenter DH5 α -Zellen auf Eis aufgetaut und 5–20 μl eines Ligationsansatzes sowie 50 μl TCM-Puffer hinzugefügt. Der Ansatz wurde für 30 Minuten auf Eis inkubiert und dann für 1,5 Minuten einem „Hitzeschock“ von 42°C unterzogen. Die Bakterien wurden kurz auf Eis abgekühlt, 500 μl vorgewärmtes LB-Medium hinzugegeben und dann für 60 Minuten unter starkem Schütteln bei 37°C inkubiert. Die Bakterienlösung wurde in Aliquots auf Indikatorplatten ausplattiert und bei 37°C ü.N. inkubiert.

Bakterienzellen, die rekombinante Vektor-DNA enthielten, wurden ü.N. in 3 ml LB-Medium mit 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ampicillin angezogen. Diese Kultur wurde als Vorkultur für die Anzucht von größeren Kulturen verwendet oder für die Präparation von Plasmid-DNA eingesetzt. Zur längerfristigen Lagerung rekombinanter Bakterienstämme wurde die Bakterienkultur mit 20 % Glycerin versetzt und bei –80°C aufbewahrt.

3.9 Koloniehybridisierung

3.9.1 Die Fixierung von Bakterienkolonien auf Membranen

Die Fixierung von Bakterienkolonien auf Membranen erfolgte im wesentlichen nach den vom Hersteller herausgegebenen Angaben in „The DIG System User’s Guide for Filter Hybridization“ (Roche, Mannheim). Es wurden folgende Veränderungen vorgenommen: die positiv geladene Nylonmembran (Hybond N⁺, Version 2.0, Amersham Pharmacia, Braunschweig) wurde für 3 Min. auf den Bakterienplatten belassen. Nach einer Proteinase K-Behandlung für 1 Stunde bei 37°C wurden die Membranen für 30 Min. bei 68°C in 2 \times SSC, 0,1 % SDS im Schüttelwasserbad gewaschen, um an den Membranen anheftende Agarosestücke und Bakterienreste zu entfernen.

3.9.2 Markierung von DNA-Sonden mit Digoxigenin, Hybridisierung und kolorimetrische Detektion

Die nicht-radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten mit DIG-High Prime, die Hybridisierung der Bakterienmembranen und die kolorimetrische Detektion wurde den Angaben des Herstellers im „The DIG System User’s Guide for Filter Hybridization“ (Roche, Mannheim) durchgeführt.

3.10 Elektrophorese-Techniken

3.10.1 Agarose-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

Die Auftrennung von Desoxyribonukleinsäuren und Ribonukleinsäuren zu analytischen oder präparativen Zwecken erfolgte in Agarosegelen nach den von Sambrook et al. (1989) beschriebenen Methoden.

3.10.2 Molekulargewichtsmarker für die Gelelektrophoresen

Zur Größen- und Mengenbestimmung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen wurden die folgenden Größenstandards von der Firma Fermentas (St. Leon-Rot) verwendet: „GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus“, „GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder“ und „Lambda DNA“.

Zur Mengenabschätzung von PCR-Fragmenten (s. 3.7.2) wurde der Größenstandard „SmartLadder“ von der Firma Eurogentec (Seraing, Belgien) verwendet.

3.11 Plastidenisolierung

In Abhängigkeit von der jeweiligen *Cuscuta*-Art und dem Reinheitsgrad der Plastiden bzw. Anreicherungsgrad der pDNA wurden unterschiedliche Methoden für die Isolierung der Plastiden verwendet.

3.11.1 Isolierung von intakten Chloroplasten aus *C. reflexa*

Isolierungsmedium	Percoll-Gradientenlösungen
0,33 M Sorbit	80 % Percoll
4 mM Natriumascorbat	
1,2 mM MnCl ₂	330 mM Sorbit
0,8 mM MgCl ₂	50 mM HEPES/KOH (pH 8,0)
4 mM EDTA	
1 mM KH ₂ PO ₄	
0,2 % BSA	30 % Percoll
4 mM DTT	
0,1 % Polyvinylpyrrolidon (PVP-10)	330 mM Sorbit
25 mM MES	50 mM HEPES/KOH (pH 8,0)
25 mM HEPES (pH 6,8)	

Waschmedium

0,33 M Sorbit
50 mM HEPES/KOH (pH 8,0)

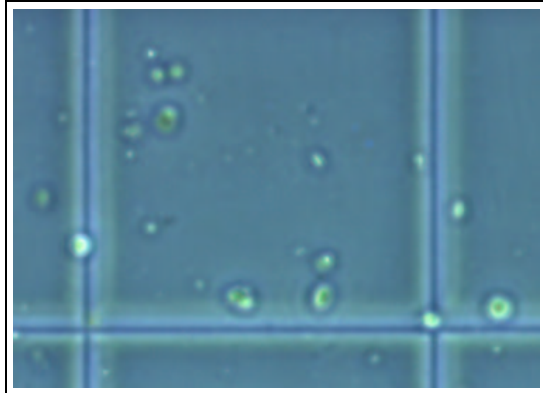
Das Sproßmaterial von *C. reflexa* wurde auf Eis geerntet und kleingeschnitten, danach im „Waring Industrial Blendor“ dreimal für je 2 Sek. auf höchster Stufe mit halbgefrorenem Isolierungsmedium zerkleinert. Grobe Zellbestandteile wurden mittels Filtration durch „Miracloth“ (Calbiochem, Frankfurt) abgetrennt. Das Filtrat wurde 1 Min. bei 4000 upm und 4°C im Rotor A6.14 (Centrikon-T124, Kontron, München) zentrifugiert. Das Sediment wurde mit einem feinen Pinsel in wenig Waschmedium aufgenommen und auf einen zweistufigen Percollgradienten gegeben. Nach Zentrifugation des Gradienten (40 Min., 7000 upm, 4°C, Rotor A8.24) wurden die intakten Plastiden, die sich auf dem unteren, hochprozentigen Percollkissen ansammelten, mit einer Pasteurpipette abgenommen, mit Waschmedium in einem Verhältnis von 1:2 versetzt und zentrifugiert (1 Min., 7000 upm, 4°C, Rotor A8.24). Die sedimentierten Plastiden wurden zweimal mit Waschmedium gewaschen und anschließend je nach weiterer Verwendung für die „Run on“-Transkription (s. 3.14.3) auf Eis gelagert oder für die DNA-Isolierung weiterverarbeitet (s. 3.12.3).

3.11.2 Mikroskopische Bestimmung der Plastidenzahl

Die Reinheit und Intaktheit sowie die Zahl der Plastiden in einer Suspension kann mikroskopisch mit Hilfe einer Thomazählkammer abgeschätzt werden. Die konzentrierte Plastidensuspension wurde zu diesem Zweck etwa 1:20 verdünnt. Intakte, von einer doppelten Hüllmembran umgebene Plastiden leuchten im Phasenkontrast auf, während Plastiden, deren doppelte Hüllmembran nicht mehr unverletzt ist, dunkel erscheinen (Abb. 6). Anhand der Plastidenzahl im Zählfeld der Thomakammer, des Kammervolumens und des Verdünnungsfaktors der Plastidensuspension kann die Plastidenzahl in der Ausgangssuspension errechnet werden. Dazu wurden in der Regel die Plastiden in 8 Großquadraten (GQ) ausgezählt (4×4 Kleinquadrate (KQ) = 1 Großquadrat (GQ)). Berechnung der Plastidenzahl:

$$\text{Plastiden}/\mu\text{l} = \frac{\text{Zahl der Plastiden pro GQ} \times 10^6 \times \text{Verdünnungsfaktor}}{4 \times 1000}$$

Abbildung 6 Isolierte Chloroplasten. Chloroplasten wurden aus *C. reflexa* über Percollgradienten isoliert und im Mikroskop unter Verwendung des Phasenkontrasts fotografiert. Die Linien begrenzen ein Kleinquadrat der Thomazählkammer.



3.11.3 Anreicherung von Plastiden aus *C. gronovii*

GM-Puffer

330 mM Sorbit
1 mM Na-Pyrophosphat
2 mM EDTA
2 mM DTT
1 mM MnCl₂
1 mM MgCl₂
50 mM HEPES/NaOH (pH 6,8)

Waschmedium

330 mM Sorbit
50 mM HEPES/NaOH (pH 8,0)

Eine Anreicherung von Plastiden aus *C. gronovii* wurde mit Hilfe einer modifizierten Methode nach Gruissem et al. (1986) und Krupinska (1992) durchgeführt. Hierzu wurde Sproßmaterial von *C. gronovii* in GM-Puffer in einem „Waring Industrial Blendor“ homogenisiert (1–2 × 2 Sek. „low“ plus 3 × 2 Sek. „high“). Grobe Zellbestandteile wurden durch Filtration durch vier Lagen „Mira cloth“ (Calbiochem, Frankfurt) abgetrennt. Das Filtrat wurde 30 Sek. bei 4°C und 5500 upm zentrifugiert (Rotor A6.14, Centrikon-T124, Kontron, München), der Überstand verworfen, und das Sediment mit einem feinen Haarpinsel in 50 ml Waschmedium aufgenommen. Die Suspension wurde zentrifugiert (20 Minuten, 7000 upm, 4°C) und das Sediment für die DNA-Isolierung (s. 3.12.3) weiterverarbeitet.

3.11.4 Anreicherung von Plastiden aus *C. odorata*

<u>Isolierungsmedium</u>	<u>Gradientenlösungen</u>
1 mM MgCl ₂ 1 mM KCl 1 mM EDTA 5 mM DTT	1 % (w/v) Agarose
0,025 % (w/v) BSA 1 % (w/v) PVP-40 1 M Sorbitol	<u>Waschmedium</u>
10 % (v/v) Ethylen-Glykol 50 mM HEPES-KOH (pH 8,0)	11 ml Isolierungsmedium 220 mg Nycodenz

Die Isolierung von Amyloplasten aus *C. odorata* wurde nach Thorbjornsen et al. (2001) durchgeführt und modifiziert. 30 g Sproßmaterial wurden in 34 ml Isolierungsmedium mit einer Rasierklinge zerkleinert, danach im „Waring Industrial Blendor“ dreimal für je 2 Sek. auf höchster Stufe homogenisiert. Die Suspension wurde durch Nylongaze mit einer Maschendichte von 60 µm filtriert und mit Hilfe einer 5 ml-Pipette mit abgeschnittener Spitze auf den Gradienten geschichtet. Die Gradienten wurden 30 Min. bei 30 × g und 4°C zentrifugiert (Rotor A-4-44, Centrifuge 5804R, Eppendorf, Hamburg); der Überstand wurde verworfen und das Sediment für die DNA-Isolierung eingesetzt (s. 3.12.3).

3.12 Extraktion von Nukleinsäuren aus Pflanzenmaterial

3.12.1 Isolierung von Gesamt-RNA nach Chirgwin

Zur Extraktion großer Mengen hochreiner RNA wurde eine nach Humbeck et al. (1994) modifizierte Methode von Chirgwin et al. (1979) angewendet.

3.12.2 Isolierung genomischer DNA aus Pflanzengewebe

Extraktionspuffer

4 M Guanidinthiocyanat
2% (w/v) Lauroylsarcosinat
25 mM Tris-HCl (pH 7,5)
10 mM EDTA
100 mM β -Mercaptoethanol

Sproßmaterial wurde in flüssigem Stickstoff zu feinem Pulver zermörsert und in Extraktionspuffer aufgenommen. Nach Abtrennen grober Zellbestandteile durch Zentrifugation ($17\,500 \times g$, 4°C , 3 Min.) wurde der Überstand mit Phenol extrahiert (s. 3.6.1) und mit Isopropanol gefällt. Das Sediment wurde nach vollständiger Trocknung in $300\ \mu\text{l}$ TE-Puffer resuspendiert und für 30 Min. bei 37°C mit RNase A (Boehringer, Mannheim) inkubiert. Die DNA wurde nochmals einer Phenol-Chloroform-Extraktion unterzogen und mit Ethanol präzipitiert (s. 3.6.2). Das Sediment wurde in $50\text{--}100\ \mu\text{l}$ TE-Puffer aufgenommen.

3.12.3 Isolierung von plDNA

DNA-Isolierungspuffer

100 mM Tris (pH 8)
20 mM EDTA (pH 8)
2% CTAB
2,5 M NaCl

Die Isolierung von plDNA aus Chloroplasten bzw. Amyloplasten verschiedener *Cuscuta*-Arten erfolgte in Anlehnung an Wulff et al. (2002). Das Sediment aus isolierten Plastiden wurde in 5 ml DNA-Isolierungspuffer aufgenommen, mit 100 mg PVP-40 versetzt und für 30 Min. bei 65°C im Schüttelwasserbad inkubiert. Die Suspension wurde für 10 Min. auf RT abgekühlt und die DNA mit einem Vol. Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert. Die wässrige Phase wurde mit 1 Vol. Isopropanol für 20 Minuten auf Eis gefällt und (4°C , 20 Min., Rotor F-34-6-38, Centrifuge 5804R, Eppendorf, Hamburg) abzentrifugiert. Das Sediment wurde mit 1 ml 70%-igem Ethanol gewaschen und nach vollständiger Trocknung in $400\ \mu\text{l}$ H_2O aufgenommen. Die DNA wurde nochmals mit 2,5 Vol. EtOH (100 %) und 1/10 Vol. NaAc (3 M) gefällt und in $50\text{--}100\ \mu\text{l}$ H_2O aufgenommen.

3.13 DNA-Sequenzierung und Sequenzanalyse

3.13.1 Automatische DNA-Sequenzierung nach Sanger

Die Sequenzierung von PCR-Fragmenten (s. 3.7.2) bzw. klonierten DNA-Fragmenten (s. 3.7) basiert auf der von Sanger et al. (1977) beschriebenen Kettenabbruchsmethode, wobei zwei verschiedene Verfahren zum Einsatz kamen.

Die Sequenzierung klonierter DNA-Fragmente oder PCR-Produkte erfolgte mit Hilfe von sequenzspezifischen Oligonukleotiden, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff (IRD800) markiert waren. Markierte Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech (Ebersberg) bezogen. Die Sequenzierung war durch ein gekoppeltes PCR-Verfahren („Cycle Sequencing“) möglich, wozu die Reagenzien des „SequiTherm EXCEL™ II Long-Read Kits“ (Biozym Diagnostics GmbH, Hess. Oldendorf) Verwendung fanden. Die Durchführung der Sequenzierungsreaktion richtete sich nach den Herstellerangaben. Für die Ausführung des vorgeschriebenen Temperaturprogramms wurde ein Thermoblock von Hybaid (MWG Biotech, Ebersberg) benutzt. Die elektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte ü.N. in einem denaturierenden Polyacrylamidgel (6% Sequagel XR, Biozym, Hameln) mit dem automatischen DNA-Sequenzierer vom Typ „LI-COR DNA Sequencer 4000L“ (MWG Biotech, Ebersberg).

Daneben wurden klonierte Plastiden-DNA-Fragmente auch mit dem „DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit“ (Pharmacia Biotech, Freiburg) in München sequenziert. Diese Sequenzreaktion basierte auf dem Einbau von mit Fluoreszenzfarbstoffen markierten Nukleotiden in einem zyklischen Sequenzierungsverfahren (Ju et al. 1995). Die Amplifikation der DNA erfolgte in 99 Zyklen, die aus Denaturierungsphase (95°C, 10 Sek.), Oligonukleotidanlagerung (46°C, 5 Sek.) und Elongationsphase (60°C, 4 Min.) bestanden. Der Reaktionsansatz wurde mit 3 Vol. EtOH gefällt, in 4 µl Formaldehydpuffer (Pharmacia Biotech, Freiburg) aufgenommen und für 2 Min. bei 80°C denaturiert. Anschließend wurde 1 µl dieser Sequenzierreaktion in einem 4,5%-igen Polyacrylamidgel mit 7M Harnstoff in 1 × TBE bei 40 mWatt auf einem automatischen ABI 377 Sequenzierer (Perkin Elmer, UK) aufgetrennt.

Zur Entfernung von Oligonukleotiden wurden zu sequenzierende PCR-Produkte mit 1 Vol. NH₄Ac und 6 Vol. Ethanol gefällt. Zur Sequenzierung wurden 20 ng pro 100 bp Amplifikat eingesetzt. Zur Sequenzierung von Plasmiden wurden 500–1000 ng DNA eingesetzt.

3.13.2 Sequenzanalyse

Die Auswertung der Sequenzdaten erfolgte mit Hilfe des Programmes „Sequencher“ (Gene Codes Corporation, USA). Die Datenbankrecherchen und Sequenzvergleiche wurden über das World Wide Web am National Center for Biotechnology Information (NCBI) mit dem BLAST-Algorithmus unter der Adresse <http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/BLAST> durchgeführt (Altschul et al. 1997). Multiple Sequenzvergleiche (engl. „Alignments“) wurden im CLUSTAL-Modus (Jeanmougin et al. 1998) mit dem Bioedit Sequenzalignment Editor (North Carolina State University) erstellt.

3.14 Analyse von plastidären Primärtranskripten

3.14.1 *Primer-Extension-Analyse*

Probenpuffer

95 % Formamid
0,5 mM EDTA
0,025 % SDS
0,025 % Bromphenolblau

10–30 μg RNA wurde bei 95°C für 2 Min. denaturiert und auf 50°C abgekühlt. Die Synthese des komplementären cDNA-Stranges wurde durch Zugabe eines mit IRD800-markierten Oligonukleotids (10 pmol) sowie 200 U *Superscript II*TM *Reverse Transcriptase* (Invitrogen, Karlsruhe) für 1 Stunde in einem Gesamtvolumen von 50 μl nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Reaktion wurde durch 3-minütiges Erhitzen auf 95°C und sofortiges Abkühlen auf Eis terminiert. Die RNA wurde durch Zugabe von 10 ng RNase A (DNase-frei) abgebaut und die synthetisierten cDNAs durch EtOH-Fällung präzipitiert. Das Sediment wurde in 5 μl Probenpuffer aufgenommen, wovon 1,5 μl auf ein denaturierendes Acrylamidgel aufgetragen wurden. Die Elektrophorese erfolgte in einem LI-COR DNA Sequenziergerät (Model 4000 L, MWG Biotech AG, Ebersberg).

3.14.2 RNA-Ligation

Für die Ligation von Gesamt-RNA mit einem RNA-Linker-Molekül wurde folgender Reaktionsansatz verwendet:

10–50 μg Gesamt-RNA
100 ng RNA-Linker-Molekül
20 U T4-RNA Ligase
40 U RNase Inhibitor
10 mM ATP
0,1 mg/ml BSA
1/10 Vol. 10 \times Ligationspuffer

Die Reaktion fand für 16 Stunden bei 17 °C statt. Der Ansatz wurde anschließend mit 2,5 Vol. 100%-igem Ethanol und 1/10 Vol. 3 M NaAc gefällt, mit 70%-igem Ethanol gewaschen und nach Trocknung des Sedimentes in die *Primer-Extension*-Reaktion (s. 3.14.1) eingesetzt. Das Schema in Abbildung 7 beschreibt die Durchführung der *Primer-Extension*-Reaktion nach vorangegangener RNA-Ligation.

3.14.3 „Run On“-Transkription

2 \times „Run on“-Mix

100 mM HEPES/KOH (pH 8,0)
20 mM MgCl_2
50 mM K-Acetat
20 mM DTT
250 mM ATP
250 mM CTP
250 mM GTP
20 U RNase Inhibitor
1 mg/ml Heparin

Stopp-Puffer

50 mM Tris/HCl (pH 8,0)
25 mM EDTA
5% Na-Sarkosinat

Plastiden

2 \times 10⁶ Plastiden/ μl in 330 mM Sorbit, 50 mM HEPES/KOH (pH 8,0)

Die „Run on“-Analyse gibt Auskunft über die Gesamttranskriptionsaktivität des plastidären Transkriptionsapparates sowie der relativen Transkriptionsaktivität bestimmter Gene im Moment der Plastidenisolierung. Die Durchführung der „Run on“-Transkriptionsanalysen mit isolierten Plastiden erfolgte in Anlehnung an veröffentlichte Protokolle (Klein & Mullet 1990; Krupinska 1992; Krause et al. 1998). Ein Standard-„Run on“-Ansatz von 100 μl Gesamtvolumen enthielt 50 μl 2 \times „Run on“-Mix, 30 μl H_2O , 10 μl α -³²P-UTP und 10 μl (=2 \times 10⁷) Plastiden. Die Plastiden wurden zu der auf 25°C vorgewärmten Lösung

3 Material und Methoden

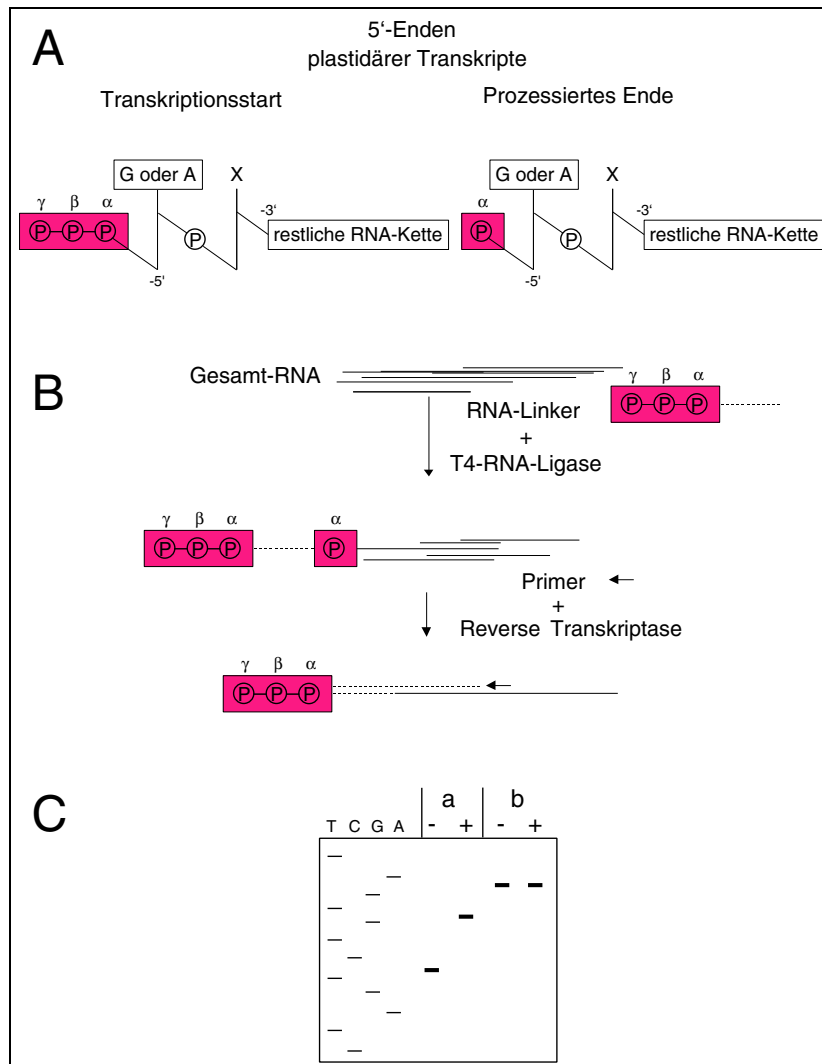


Abbildung 7 (A) Molekulare Zusammensetzung plastidärer Transkriptionsstarts im Vergleich zu prozessierten 5'-RNA-Enden. Der Transkriptionsstart zeichnet sich durch 3 Phosphoratome in γ -, β - und α -Stellung aus, wogegen sich ein prozessiertes 5'-RNA-Ende durch ein Phosphor-Atom in α -Stellung auszeichnet. (B) Ligation des RNA-Linkers an die prozessierten Enden der Gesamt-RNA. An 5'-Enden, die an einem Transkriptionsstart generiert wurden, ist eine Ligation mit dem RNA-Linker durch die drei Phosphor-Atome nicht möglich. In der darauffolgenden *Primer-Extension*-Reaktion verlängert sich die synthetisierte cDNA um die Länge des RNA-Linkers. (C) Laufverhalten von ligierten und nicht-ligierten cDNAs auf einem Sequenzgel. Ansatz (a) zeigt ein prozessiertes Ende ohne (-) und mit (+) RNA-linker. Ansatz (b) zeigt einen echten Transkriptionsstart ohne (-) und mit (+) RNA-Linker. Die Sequenzreaktion dient zur Größenabschätzung der Fragmente.

aus Puffer, Wasser und Radiouridintriphosphaten gegeben und 6 Min. bei 25°C inkubiert, woraufhin die weitere Transkription durch Zugabe von 20 µl Stopp-Puffer unterbunden wurde. In neu synthetisierte RNA eingebaute radioaktive Nukleotide konnten mit Hilfe der von Hallick et al. (1976) beschriebenen und leicht modifizierten Methode bestimmt werden, bei der die RNA an DE81-Filter gebunden und so von freien Nukleotiden getrennt wird (Suck 1996). Die Messung der radioaktiven Filter erfolgte in 2,5 ml Szintillationscocktail (Rotiscint™, Roth, Karlsruhe) in einem Szintillationsmeßgerät (Typ LS 6000 TA, Beckman, München). Aus dem Verhältnis von eingesetzter und eingebauter Radioaktivität läßt sich die Transkriptionsaktivität ermitteln.

3.15 „Dot Blot“-Analyse

3.15.1 Herstellung von strangspezifischen Sonden durch *In vitro*-Transkription

Zur Herstellung von *In vitro*-Transkripten wurde der Vektor pBluescript (Stratagene, La Jolla, USA) sowie Vektoren mit plastidären Genen mit dem gewünschten Restriktionsenzym linearisiert (s. 3.7.1). Der so präparierte Vektor diente als Matrize für die käufliche T3- und T7-RNA-Polymerase (Boehringer, Mannheim). Nach Angaben des Herstellers wurden ausgehend von dem T3- bzw. T7-Promotor des Vektors ein einzelstrangspezifisches *In vitro*-Transkript hergestellt.

3.15.2 Herstellung von „Dot Blot“-Filtern

Plastidengenomspezifische *In vitro*-Transkripte wurden mit Hilfe einer „Dot Blot“-Apparatur (Schleicher und Schuell, Dassel) unter neutralen Bedingungen (20 × SSC) auf Nylon-Membranen (Hybond N⁺, Amersham Pharmacia, Braunschweig) transferiert. Die Transkripte wurden hierzu in den Verdünnungen von 1600 fmol, 400 fmol und 100 fmol aufgetragen (Krause et al. 2000). Die RNA wurde durch UV-Vernetzung (UV-Stratalinker 1800, Stratagene, La Jolla, Kalifornien, USA) auf der Membran fixiert.

3.16 DNA-/RNA-Hybridisierung

3.16.1 Kapillartransfer von Nukleinsäuren auf Membranen

Nukleinsäuren wurden aus Agarosegelen mit Hilfe von Standardprotokollen durch Kapillartransfer (Southern 1975) auf positiv geladene Nylonmembranen (Hybond N⁺, Amersham Pharmacia, Braunschweig) transferiert (Sambrook et al. 1989). Beim Transfer von DNA wurde 0,4 M NaOH als Transferlösung verwendet. RNA wurde dagegen in Gegenwart von 10 × SSC (1,5 M NaCl, 150 mM Natriumcitrat) auf die Membran übertragen. Die Fixierung der Nukleinsäuren auf der Membran erfolgte durch Backen bei 80°C für 2 Stunden. Die auf der Nylonmembran immobilisierten Ribonukleinsäuren wurden durch Färbung mit Methyleneblau (0,04 % (w/v) in 0,5 M Natriumacetat, pH 5,2) sichtbar gemacht (Sambrook et al. 1989), um die Positionen des Größenstandards sowie die gleichmäßige Beladung der Spuren mit RNA zu überprüfen.

3.16.2 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden durch „Random Primed Labeling“

DNA-Fragmente wurden mit Hilfe des „Random Primed Labeling Kit“ (Boehringer, Mannheim) nach Angaben des Herstellers mit radioaktivem α -³²P-dCTP markiert. Freie Nukleotide wurden anschließend durch Gelfiltration (Spinocolumns G25, Amersham Pharmacia, Braunschweig) nach Angaben des Herstellers abgetrennt.

3.16.3 Endmarkierung von RNA

Ein Reaktionsansatz umfaßte die folgenden Komponenten:

10 μ g Gesamt-RNA
20 U T4-RNA Ligase
20 μ Ci ³²P-pCp
10 mM ATP
1 mg/ml BSA
1/10 Vol. 10 × Ligationspuffer

Der Ansatz wurde für 4 Stunden bei 37°C inkubiert, mit 1 Vol. Isopropanol und 1/10 Vol. NaAc (3 M) gefällt und mit 70%-igem Ethanol gewaschen. Das Sediment wurde nach Zentrifugation (20 Min., 14 000 upm) in 50 μ l DEPC-H₂O aufgenommen und mit 50 μ l 50%-igem Formamid versetzt.

3.16.4 Hybridisierung von membrangebundener DNA mit ³²P-markierten Nukleinsäure-Fragmenten

Die Hybridisierung von Membranen mit darauf immobilisierten DNA-Fragmenten und die sich anschließenden Waschschriffe erfolgten nach den Angaben des Herstellers der „Hybond N⁺“ positiv geladenen Nylonmembran (Version 2.0, Amersham Pharmacia, Braunschweig). Die in der Hybridisierung verwendeten Sonden wurden in einer Konzentration von 1×10^{-6} cpm pro ml Hybridisierungslösung eingesetzt. Die Hybridisierung erfolgte ü.N. bei 65°C.

3.16.5 Detektion von Hybridisierungssignalen

Die Membranen wurden von außen sorgfältig getrocknet, in Frischhaltefolie eingeschlagen und in einer Autoradiographiekassette mit einer „Imaging Plate“ (IP, Fuji) belegt. Nach einer Exposition von 24 Stunden bei Raumtemperatur wurde die IP in den „FLA-5000 BioImager“ (Fuji) eingelegt und ausgelesen. Der Auslesevorgang erfolgte mit einer Auflösung von 200 μm und einer Farbtiefe von 16 Bit und ermöglichte eine Darstellung der Hybridisierungssignale mit bis zu 65556 Graustufen.

Die Membranen wurden anschließend in einer Autoradiographiekassette mit 1 bis 2 Verstärkerfolien (Intensifying Screens, Amersham Pharmacia, Braunschweig) bei -80°C auf Röntgenfilm (Hyperfilm MP, Amersham Pharmacia) für 3 Tage bis 2 Wochen exponiert.

3.16.6 Densitometrische Auswertung von Hybridisierungssignalen

Die Auswertung der mit dem „FLA-5000 BioImager“ analysierten Signale, die durch Hybridisierungen von DNA-„Dot Blot“-Membranen (s. 3.15.2) erhalten wurden, erfolgte densitometrisch mit der Spezialsoftware „AIDA Image Analyser v3.10“ (Raytest, Straubenhardt). Die Software quantifizierte und integrierte die Signalintensitäten über vorher definierte Kreisflächen von $22,6 \text{ mm}^2$ über den Hybridisierungssignalen und gab sie als numerischen Wert aus. Diese wurden in „Staroffice Starcalc“TM weiterbearbeitet.

4 Ergebnisse

4.1 Sequenzanalyse des Plastidenchromosoms von *C. reflexa*

Voraussetzung für die Analyse der plastidären Genexpression und ihrer regulativen Elemente ist die Kenntnis der DNA-Sequenz des plastidären Chromosoms. In diesem Abschnitt sind die Subklonierung und Sequenzierung des Plastidenchromosoms von *C. reflexa* sowie eine Auswertung der Sequenzdaten zusammengefaßt.

4.1.1 Herstellung einer plastidären Klonbank

Zur Herstellung einer plastidären Klonbank aus *C. reflexa* wurden über Percollgradienten Chloroplasten isoliert (s. 3.11.1), aus denen pDNA extrahiert werden konnte. Die so aufbereitete DNA wurden jeweils mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI, *Hind*III, *Pst*I und *Pst*I/*Sal*I geschnitten. Die im Agarosegel aufgetrennte, mit den verschiedenen Enzymen verdaute DNA zeigte keine diskreten Banden, wie es für reine pDNA zu erwarten gewesen wäre, sondern vielmehr einen Schmier (Abb. 8). Daher mußte auf eine Kontamination der pDNA mit genomischer DNA geschlossen werden. Eine bevorzugte Klonierung von plastidären gegenüber genomischen Fragmenten in diesem Gemisch wurde nach Restriktionsverdau der DNA mit *Pst*I erreicht. Dieses Enzym schneidet nur sehr selten in der genomischen DNA und liefert somit nur sehr große, schlecht klonierbare Fragmente des Kerngenoms.

Die erhaltenen Fragmente wurden in den Vektor pBS SK (-), der ebenfalls mit *Pst*I, *Bam*HI bzw. *Hind*III geschnitten wurde, kloniert. Zur Identifizierung plastidärer Fragmente wurde ein „Koloniescreening“ der Klonbank mit DIG-markierter pDNA aus *Spinacea oleracea* und mit homologen PCR-Sonden aus *C. reflexa* durchgeführt (s. 3.9).

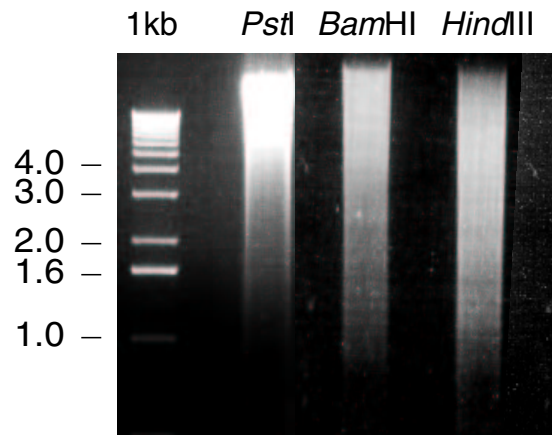


Abbildung 8 Gelelektrophorese der *Pst*I-, *Bam*HI- und *Hind*III-Restriktionsverdaus der angereicherten pDNA von *C. reflexa*. Links aufgetragen ist der 1kb-Größenmarker. Die Fragmentgrößen des Markers sind links neben der Abbildung angegeben.

Auf diese Weise konnten DNA-Fragmente bis zu einer Größe von 10 kb kloniert werden. Die sich in der ersten Hybridisierung als positiv erwiesenen Klone wurden einer zweiten Hybridisierung unterzogen, um das Ergebnis zu verifizieren. Hierzu wurde die Plasmid-DNA direkt auf eine Nylonmembran aufgetragen. Positive Klone aus der zweiten Hybridisierung wurden mit den Primern „M13-forward“ und „M13-reverse“ ansequenziert, um den klonierten Bereich des Plastidenchromosoms zu identifizieren. Die so analysierten Klone wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Herrmann an der LMU-München sequenziert (s. 3.13). Ein Vergleich der Sequenzen mit der veröffentlichten Sequenz des Plastidenchromosoms von Tabak zeigte, welche Bereiche vorhanden waren. Die Abbildung 9 zeigt ein Beispiel eines ca. 5,5 kb großen *Pst*I-ligierten Fragments des Plastidenchromosoms von *C. reflexa* welches auf diese Weise identifiziert wurde.

Drei in der NCBI-Gendatenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, 05/2003) annotierte Teilsequenzen des Plastidenchromosoms von *C. reflexa* wurden mit in die Assemblierung der Gesamtsequenz einbezogen (Akzessionsnummern in Genbank X67512, X61698, X72584). Die identifizierten Plastomfragmente sind in Tabelle 3 unter Angabe der Größe und Homologien zum Plastidenchromosom von *N. tabacum* zusammengefasst. Die Abbildung 10 gibt die relative Lage und Größe der rekombinaten pDNA-Klone von *C. reflexa* im Vergleich zum Plastidenchromosom von *N. tabacum* an.

4 Ergebnisse

Tabelle 3 Sequenzierung des Plastidenchromosoms aus *C. reflexa*. Die Tabelle umfaßt eine Liste aller Klone unter Angabe des Namens, der Art des verwendeten Vektors, der Größe des klonierten Fragmentes, der entsprechenden Bereiche in der pDNA von *N. tabacum* und der identifizierten Gene in *C. reflexa*. Die Bezeichnungen noch nicht sequenzierter Klone sind *kursiv* gedruckt.

Klonname/ Akz.Nr.	Enzym	Vektor	Größe (bp)	entsprechende Bereiche in der pDNA von <i>N. t.</i>	identifizierte Gene
X67512			5316	145822–2274	<i>psbA, trnA, trnL, orf740, orf77, orf55</i>
Klon_PS1	<i>PstI/SalI</i>	pBsc	8708	1365–10073	<i>trnG, trnS, psbI, psbK, trnQ, rps16, matK, psbA</i>
<i>Klon_B2</i>	<i>BamHI</i>	<i>pBsc</i>		<i>13850–21955</i>	
Klon_PS2	<i>PstI/SalI</i>	pBsc	1300	25343–26698	<i>rpoB</i>
Klon_B1	<i>BamHI</i>	pBsc	6953	29509–36462	<i>psbC, psbD, trnT, ycf6</i>
Klon_H2	<i>HindIII</i>	pBsc	6763	29520–36283	<i>psbC, psbD, ycf6</i>
<i>Klon_P1</i>	<i>PstI</i>	<i>pBsc</i>		<i>34426–42049</i>	
X61698			6085	53755–59028	<i>petE, trnV, trnM, atpE, atpB, rbcL</i>
Klon_PS4	<i>PstI/SalI</i>	pBsc	4315	55377–70748	<i>rps18, rpl33, psaI, trnG, trnW, petG, petL, rbcL</i>
X67512			5316	86686–96510	<i>psbA, trnA, trnL, orf740, orf77, orf55</i>
X72584			8807	96510–106175	<i>trnA, trnI, rps7, rps12, ndhB, 16SrRNA</i>
Klon_H1	<i>HindIII</i>	pBsc	1300	108419–109719	<i>rrn5, rrn4.5, rrn23</i>
Klon_SSC1	PCR	pGEM-T	2649	109599–117285	<i>rrn5, trnR, trnN, orf75, rpl32, ycf5, trnL</i>
<i>Klon_SSC3</i>	PCR	<i>pGEM-T</i>	<i>5000</i>	<i>116365–129000</i>	
<i>Klon_SSC2</i>	PCR	<i>pGEM-T</i>	<i>2500</i>	<i>128821–131988</i>	
Klon_SSC1	PCR	pGEM-T	1398	131802–133200	<i>rrn5, trnR, trnN, orf75</i>
Klon_H1	<i>HindIII</i>	pBsc	1300	133200–134207	<i>rrn5, rrn4.5, rrn23</i>
X72584			8807	136423 - 145753	<i>trnA, trnI, rps/, rps12, ndhB, 16SrRNA</i>
Klon_PS3	<i>PstI/SalI</i>	pBsc	2500	144922–147145	<i>ycf2, ycf15, orf92, orf115, orf79, trnL, ndhB</i>

4 Ergebnisse

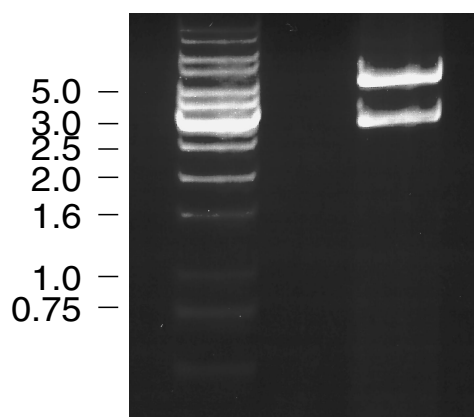


Abbildung 9 Rekombinanter Klon mit einem über *Pst*I-ligierten ca. 5,5 kb großen Fragment des Plastidenchromosoms von *C. reflexa*. Der Klon wurde mit dem Restriktionsenzym *Pst*I verdaut und in einem 1%-igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Links aufgetragen ist der 1kb-Größenmarker. Die Fragmentgrößen des Markers sind links neben der Abbildung angegeben.

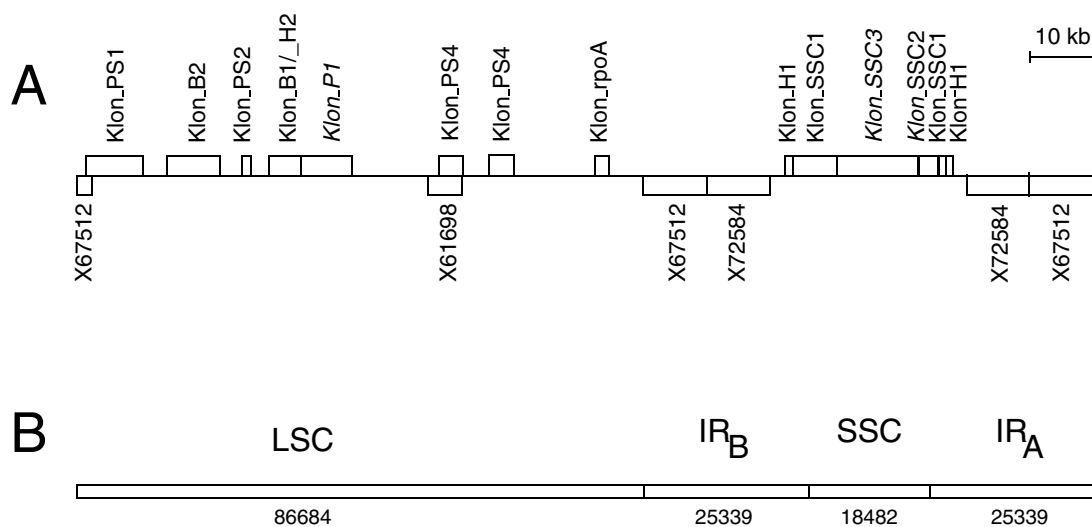


Abbildung 10 Relative Lage und Größe der rekombinanten pDNA-Klone von *C. reflexa* im Vergleich zum Plastidenchromosom von *N. tabacum*. (A) Anordnung der rekombinanten Klone anhand des Plastidenchromosoms von *N. tabacum*. Bereits in der Datenbank vorhandene Klone sind mit ihrer Akzessionsnummer bezeichnet (X...) und unterhalb der Linie angeordnet. (B) Schematische Darstellung des Plastidenchromosoms von *N. tabacum*. Die Bezeichnungen der bisher nicht sequenzierten Klone sind *kursiv* gedruckt.

4.1.2 PCR-Produkte

Ein Großteil der Zwischenräume zwischen den Klonen wurden durch die Sequenzierung überlappender PCR-Produkte geschlossen (Tab. 4). Als Matrize für die PCR-Reaktionen diente aus *C. reflexa* isolierte Gesamt-DNA. Die Abbildung 11 gibt einen Überblick über die PCR-Produkte, die beispielhaft den Bereich *psbB* bis *rpl22* abdecken. Die Gesamtsequenz des Bereichs wurde durch die Einzelsequenzen der überlappenden PCR-Produkte zusammengesetzt.

Tabelle 4 Sequenzierung des Plastidenchromosoms aus *C. reflexa*. Die Tabelle umfaßt eine Liste der durch überlappende PCR-Produkte sequenzierten Bereiche unter Angabe der Größe in bp, der entsprechenden Bereiche in der plDNA von *N. tabacum* und identifizierter Gene in *Cuscuta reflexa*.

Größe (bp)	entsprechende Bereiche in <i>N.t.</i>	identifizierte Gene
3777	10073–13850	<i>rps16, trnQ, psbK, psbI, trnS, trnG, trnR, atpA, atpE, atpH</i>
4705	22797–27502	<i>rpoC1, rpoB</i>
8555	75780–79303	<i>psbB, psbT, psbN, psbH, petB, petD</i>
2000	79303–81469	<i>petD, rpoA, rps11</i>
5061	81469–86530	<i>rpl36, infA, rps8, rpl14, rpl16, rps3, rpl22</i>

4 Ergebnisse

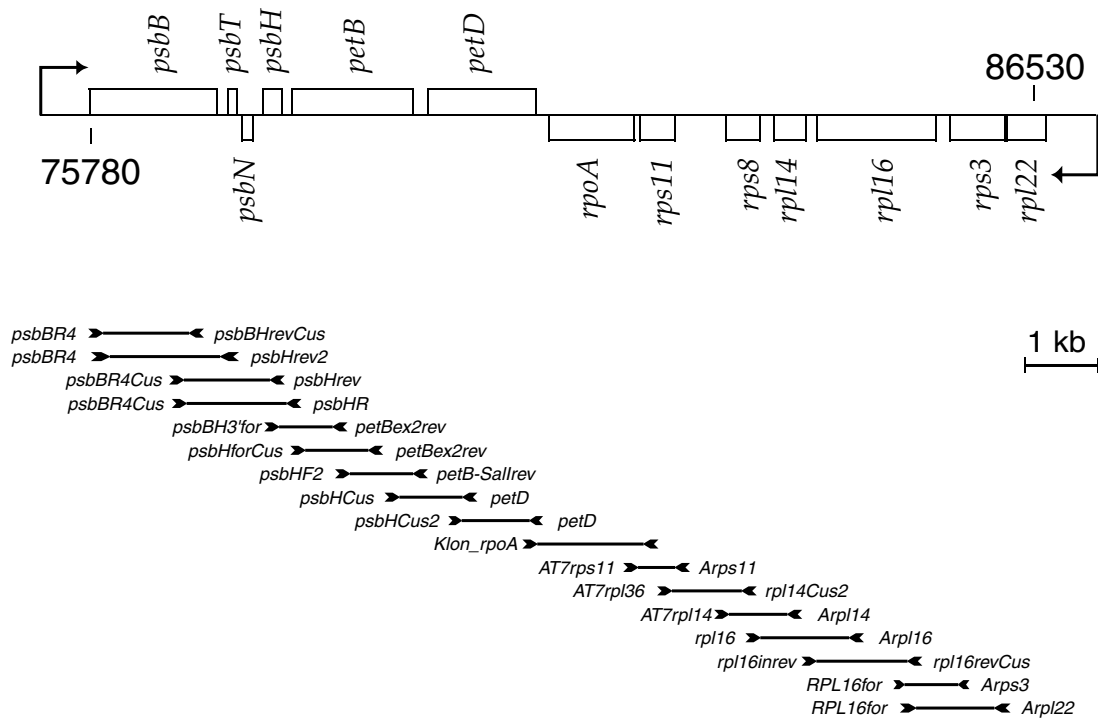


Abbildung 11 Schematische Darstellung der Sequenz *psbB-rpl22* in *C. reflexa* und relative Lage der PCR-Produkte. Die Pfeile geben die Transkriptionsrichtung der Gene an. Die Zahlen an den Enden des Diagramms geben die Lage der Gene auf dem Plastidenchromosom von *N. tabacum* an. Die Namen an den Enden der PCR-Produkte bezeichnen die zur Amplifikation verwendeten Primer.

4 Ergebnisse

In der Tabelle 5 sind alle bereits sequenzierten Gene des Plastidenchromosoms von *C. reflexa* nach ihrer Funktion zusammengefaßt.

Tabelle 5 Klassifikation aller sequenzierten Gene des Plastidenchromosoms von *C. reflexa*. Von mit * gekennzeichneten Genen liegen nur Teilsequenzen vor.

RNA-Gene	Ribosomale RNA	<i>rrn23*</i> , <i>rrn16</i> , <i>rrn5</i> , <i>rrn4.5</i>
	Transfer-RNA	<i>trnA</i> (<i>ugc</i>), <i>trnC</i> (<i>gca</i>), <i>trnE</i> (<i>uuc</i>), <i>trnF</i> (<i>gaa</i>), <i>trnG</i> (<i>ucc</i>), <i>trnH</i> (<i>gug</i>), <i>trnL</i> (<i>caa</i>), <i>trnL</i> (<i>uaa</i>), <i>trnL</i> (<i>uag</i>), <i>trnM</i> (<i>cau</i>), <i>trnN</i> (<i>guu</i>), <i>trnP</i> (<i>ugg</i>), <i>trnQ</i> (<i>uug</i>), <i>trnR</i> (<i>acg</i>), <i>trnR</i> (<i>ucu</i>), <i>trnS</i> (<i>gcu</i>), <i>trnV</i> (<i>gac</i>), <i>trnV</i> (<i>uac</i>), <i>trnW</i> (<i>cca</i>), <i>trnY</i> (<i>gua</i>)
Proteingene	Ribosomale Proteine	<i>rpl14</i> , <i>rpl16</i> , <i>rpl22*</i> , <i>rpl32</i> , <i>rpl33</i> , <i>rpl36</i> , <i>rps3</i> , <i>rps4</i> , <i>rps7</i> , <i>rps8</i> , <i>rps11</i> , <i>rps12</i> , <i>rps18</i>
	Transkription	<i>rpoA</i> , <i>rpoB*</i>
	Photosynthese	<i>rbcL</i> , <i>psaJ</i> , <i>psaC*</i> , <i>psbA</i> , <i>psbB*</i> , <i>psbC*</i> , <i>psbD</i> , <i>psbH</i> , <i>psbI</i> , <i>psbJ</i> , <i>psbK</i> , <i>psbL</i> , <i>psbM</i> , <i>psbN</i> , <i>psbT</i> , <i>atpA</i> , <i>atpB</i> , <i>atpE</i> , <i>atpF</i> , <i>atpH*</i> , <i>petB</i> , <i>petD</i> , <i>petL</i> , <i>petG</i>
	Andere proteinkodierende Gene	<i>matk</i>
	Konservierte Leserahmen	<i>ycf1*</i> , <i>ycf2</i> , <i>ycf5</i> , <i>ycf9</i> , <i>orf15</i> , <i>orf55</i> , <i>orf70a*</i> , <i>orf70b</i> , <i>orf75</i> , <i>orf77</i> , <i>orf131</i> , <i>orf740</i>

4.2 Struktur und Gengehalt des Plastidenchromosoms von *C. reflexa* im Vergleich zu *N. tabacum*

Der Vergleich von Sequenzen des Plastidenchromosoms von *C. reflexa* mit einer nicht-parasitisch lebenden, photosynthetisch aktiven Pflanzenart gibt Aufschluß über die Auswirkungen der parasitischen Lebensweise auf den Grad der Konservierung des Plastidenchromosoms. Sowohl *N. tabacum* als auch *C. reflexa* gehören der dikotylen Familie der Solanaceae an. Aufgrund dieser engen Verwandtschaftsbeziehung und der Verfügbarkeit der vollständigen Sequenz des Plastidenchromosoms von *N. tabacum* beziehen sich die Sequenzvergleiche von *C. reflexa* vorwiegend auf diese Art.

4.2.1 Vergleich kodierender Regionen

Die im Folgenden angeführten Sequenzvergleiche in den kodierenden Bereichen der Plastidenchromosomen von *C. reflexa* und *N. tabacum* geben Aufschluß über den Grad der Konservierung der kodierenden Sequenzen.

Abbildung 12 zeigt die Häufigkeit von Nukleotidsubstitutionen pro 100 bp von ausgewählten proteinkodierenden Genen des Plastidenchromosoms von *C. reflexa* im Vergleich zu *N. tabacum*. Die erste und zweite Kodonposition zeigt mit etwa 2 Austauschen pro 100 bp eine deutlich niedrigere Substitutionsrate als die dritte Kodonposition, für die 6–8 Austausche pro 100 bp ermittelt wurden.

Der Austausch von Aminosäuren in den entsprechenden Proteinen ist in Abbildung 13 dargestellt. Besonders stark konserviert sind die Untereinheiten des Photosystems II (kodierende Gene *psbA*, *psbB*, *psbC* und *psbD*), Untereinheiten des Cytochrom b_6/f -Komplexes (*petB*, *petD*, *petN*) sowie das ribosomale Protein *rps7*. Bei diesen Proteinen liegt die Häufigkeit von Aminosäureaustauschen unter 5%. Höhere Substitutionsraten zeigen die Untereinheiten der plastidären ATPase (kodierende Gene: *atpA*, *atpB*), assoziierte Photosynthesepoteine (Gene: *psaJ*, *psbT*, *psbH*) und Proteine des plastidären Genexpressionssystems (Gene: *rpoB*, *rpl33*, *rpl18*, *rps3*). Unter den Proteinen, die eine hohe Substitutionsrate aufweisen, sind die α -Untereinheit der plastidär kodierten RNA-Polymerase und Photosynthesepoteine wie z.B. die ϵ - und ζ -Untereinheiten der plastidären ATPase. Die plastidäre Maturase ist mit einer Austauschrate von 32,5 % das am wenigsten konservierte Gen.

4 Ergebnisse

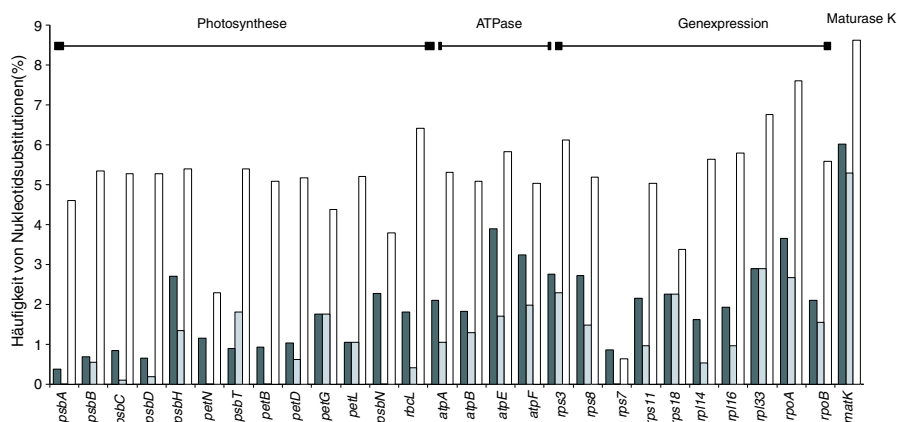


Abbildung 12 Häufigkeit von Nukleotidsubstitutionen an 1., 2. und 3. Kodonposition proteinkodierender Gene auf dem Plastidenchromosom von *C. reflexa* im Vergleich zu *N. tabacum* pro 100 bp. Die proteinkodierenden Gene sind nach ihrer Funktion in die Gruppen „Photosynthese“, „ATPase“, „Genexpression“ und „Maturase K“ geordnet. Veränderungen in der 1. Kodonposition sind durch schwarze Balken, solche in der 2. und 3. Kodonposition durch graue bzw. weiße Balken repräsentiert.

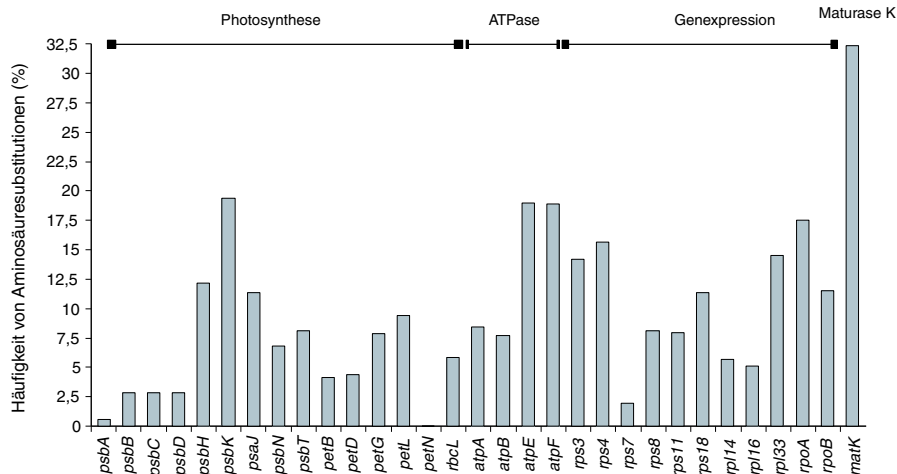


Abbildung 13 Prozentuale Häufigkeit von Aminosäuresubstitutionen in plastidencodierten Proteinen von *C. reflexa* im Vergleich zu *N. tabacum*. Die proteinkodierenden Gene sind nach ihrer Funktion in die Gruppen „Photosynthese“, „ATPase“, „Genexpression“ und „Maturase K“ geordnet.

Insertionen/Deletionen (Indels)

In den sequenzierten proteinkodierenden Genen von *C. reflexa* finden sich im Vergleich zu *N. tabacum* 11 Indels. Fünf davon sind Deletionen, sechs Insertionen. Im *atpB*-Gen von *C. reflexa*, das für die β -Untereinheit der ATPase kodiert, fehlen im Vergleich zu *N. tabacum* zwei hintereinander liegende Kodons, die auch in allen anderen untersuchten Pflanzenarten konserviert sind (Abb. 14A). Indels in den letzten Aminosäuren einer Proteinsequenz sind in den Genen *psbT*, *rbcl*, *rpl16*, *rps3* und *psaJ* zu finden (nicht gezeigt). Die α -Untereinheit der plastidär kodierten RNA-Polymerase zeigt Deletionen in zwei aufeinanderfolgenden Aminosäuren (Abb. 14B). Dieser Bereich ist in allen anderen untersuchten Pflanzenarten bis auf *Lotus japonicus* und *Marchantia polymorpha* stark konserviert. Welche Bedeutung diese Deletion in *C. reflexa* hat, ist unklar.

A	<i>N. tabacum</i>	VVQGRDS V GQPINVACEVQQL	B	<i>N. tabacum</i>	MPVRNANHSIHSY G NGNEKQEI
	<i>C. reflexa</i>	I . K . . . T - - EQM . . T		<i>C. reflexa</i> N
	<i>A. thaliana</i>	. . K . . . T L . . E . . . T		<i>A. thaliana</i>	. . . E
	<i>O. elata</i>	. . K . . . T G . . E . . . T		<i>O. elata</i> Q
	<i>L. japonicus</i>	I . K . . . T . . Q . . . T		<i>L. japonicus</i> V
	<i>S. oleracea</i>	I . K . . . T A . . M . . T		<i>S. oleracea</i> V
	<i>M. polymorpha</i>	I . K D Q N . A . E E . . T		<i>M. polymorpha</i>	. . I . . . Y . V . . F E S E K K I K . .
	<i>E. virginiana</i>		<i>E. virginiana</i>
	<i>O. sativa</i>	. . K S . . T D . K Q . . T		<i>O. sativa</i> V . Y . . F A C A . Y . .
	<i>Z. mays</i>	I . K S . . T A D K Q . . . T		<i>Z. mays</i> V . Y . . F . C H . .

Abbildung 14 Vergleich der abgeleiteten partiellen Aminosäuresequenz der β -Untereinheit der plastidären ATPase (kodiert durch *atpB*) (A), sowie für die α -Untereinheit der PEP (kodiert durch *rpoA*) (B). Fett gedruckt sind Aminosäuren, die im Vergleich zu Tabak bei *C. reflexa* deletiert sind. Ein Punkt zeigt eine Übereinstimmung, ein Strich eine Deletion an.

4.2.2 Deletionen

Die bisherigen Ergebnisse zur Sequenzierung des Plastidenchromosoms von *C. reflexa* deuten darauf hin, daß die in Tabelle 6 zusammengefaßten Gene nicht mehr in der Sequenz von *C. reflexa* enthalten sind.

RNA	Transfer-RNA	<i>trnK</i> (UUU), <i>trnI</i> (CAU) ⁺ , <i>trnV</i> (UAC) ⁺
Protein- gene	Ribosomale Proteine	<i>rpl2</i> ⁺ , <i>rpl23</i> ⁺ , <i>rps16</i> [*]
	NADH- Dehydrogenase	<i>ndhB</i> ^{**} , <i>ndhF</i> <i>ndhA</i> ⁺ , <i>ndhC</i> ⁺ , <i>ndhD</i> ⁺ , <i>ndhE</i> ⁺ , <i>ndhG</i> ⁺ , <i>ndhH</i> ⁺ , <i>ndhI</i> ⁺ , <i>ndhJ</i> ⁺ , <i>ndhK</i> ⁺ (Haberhausen & Zetsche 1994)
	Konservierte Leserahmen	<i>ycf15</i> ^{**}

Tabelle 6 Gendelektionen auf dem Plastidenchromosom von *C. reflexa*. Die mit * gekennzeichneten Gene sind als Pseudogene vorhanden. Gendelektionen, die aus der Literatur bekannt sind (Haberhausen et al. 1992; Haberhausen & Zetsche 1994; Bömmers et al. 1993), sind mit + gekennzeichnet.

Deletion von tRNAs

In *C. reflexa* fehlt *trnK-UUU*, dessen Exonbereiche rechts und links des Gens *matk* angeordnet sind. Das Gen für diese tRNA wurde in den Plastidenchromosomen anderer Höherer Pflanzen nur an dieser Stelle lokalisiert (bei *Epifagus* fehlt diese tRNA), weshalb anzunehmen ist, daß dieses tRNA-Gen nicht mehr auf dem Plastidenchromosom vorhanden ist. Auch das Gen für *trnV-UAC* weist eine große Deletion im Intronbereich auf, die dieses Gen zu einem Pseudogen macht. *trnI-CAU* ist das dritte tRNA-Gen, das dem Plastidenchromosom von *C. reflexa* fehlt.

Anhand von bereits in den Datenbanken vorhandenen plastidären Sequenzen von *C. reflexa* (X67512, X61698, X67512, X72584) wurde die Verteilung von Basentriplets in den kodierenden Sequenzen ermittelt (*Codon Usage Database* des Kazusa DNA Research Institute, <http://www.kazusa.org.jp/codon>, 05/2003). Somit kommt das Kodon UUU des Gens *trnK* 97 mal unter 3384 Basentriplet der 11 untersuchten kodierenden Sequenzen vor, das Kodon CAU des Gens *trnI* insgesamt 50 mal und das Kodon UAC des Gens *trnV* 34 mal. Ein Verlust der tRNAs geht damit nicht mit einer Änderung im Kodongebrauch einher.

Deletion des *rps16*-Genes

Der Sequenzvergleich des Abschnittes *psbA* bis *atpA* auf den Plastidenchromosomen von *N. tabacum*, *C. reflexa* und *Epifagus virginiana* zeigt sehr ähnliche Deletionen von Genen in den beiden parasitisch lebenden Pflanzen im Vergleich zu *N. tabacum* (Abb. 15). Sowohl in *C. reflexa* als auch in *E. virginiana* fehlt *trnK* und ein funktionales *rps16*-Gen, welches in *C. reflexa* nur noch als Pseudogen vorhanden ist. Das *matK*-Gen ist in beiden Parasiten als vollständiges Gen erhalten, wie auch die oberhalb liegenden tRNAs *trnQ* und *trnS*. Die Gene *psbA* und *atpA* liegen in *E. virginiana* als Pseudogene vor, in *C. reflexa* ist der vollständige Leserahmen erhalten. Durch die Gendeletion ist die Sequenz dieses Plastomabschnittes in *E. virginiana* 2827 bp, in *C. reflexa* 8216 bp und in *N. tabacum* 11707 bp lang.

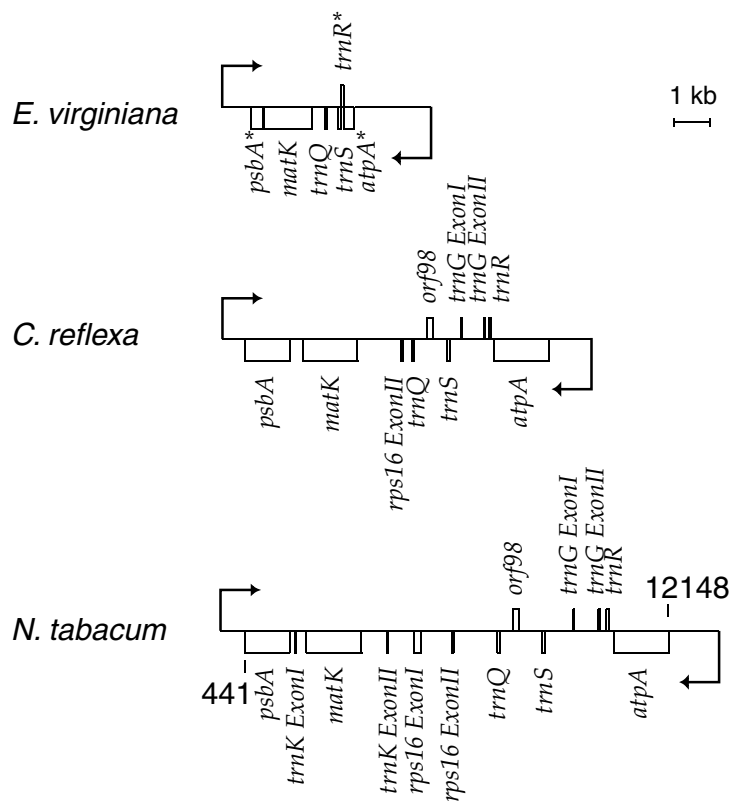


Abbildung 15 Vergleich des Plastidenchromosoms im Bereich *psbA*–*atpH* aus *C. reflexa* mit den entsprechenden Bereichen aus *E. virginiana* und *N. tabacum*. Die Zahlen an den Enden des Diagramms geben die Lage der Gene auf dem Plastidenchromosom von *N. tabacum* an. Die Pfeile zeigen die Transkriptionsrichtung.

Deletion der *ndh*-Gene

Auch die *ndh*-Gene sind bei *C. reflexa* deletiert, was beispielhaft für das *ndhF*-Gen in der *Single Copy Region* des Plastidenchromosoms gezeigt ist. Bereiche rechts der ursprünglichen Sequenz des *ndhF*-Genes liegen in umgekehrter Reihenfolge vor (Abb. 16). Im Vergleich zu der entsprechenden Sequenz von *N. tabacum*, die 7135 bp lang ist, beträgt die Länge dieses Bereiches in *C. reflexa* bedingt durch die Deletion 2649 bp.

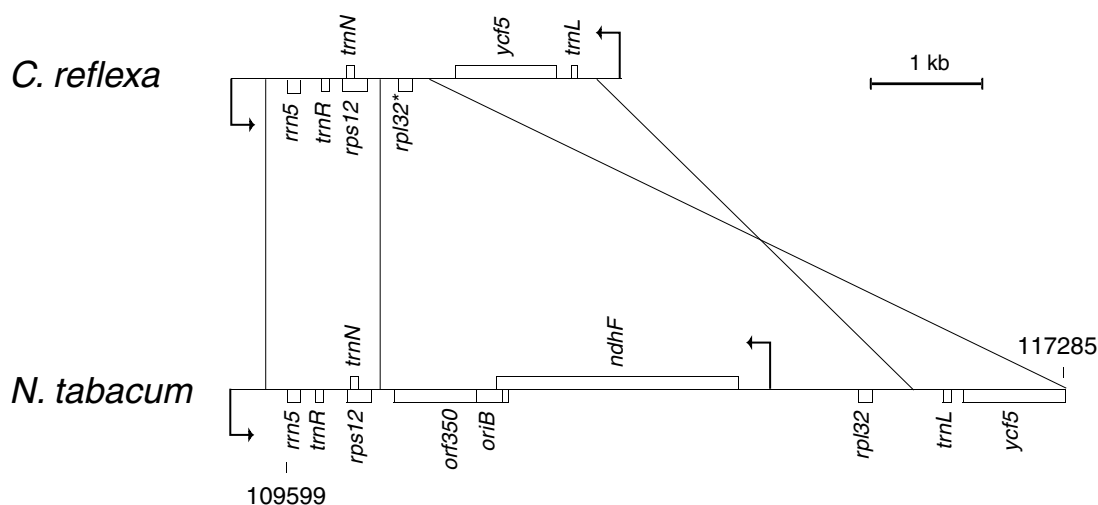


Abbildung 16 Vergleich des DNA-Bereiches *rrn5-trnL* aus *C. reflexa* mit der entsprechenden Region aus *N. tabacum*. Die Zahlen an den Enden des Diagramms geben die Lage der Gene auf dem Plastidenchromosom von *N. tabacum* an. Die Pfeile zeigen die Transkriptionsrichtung.

Deletion eines Replikationsursprungs

Durch elektronenmikroskopischen Nachweis von Replikationsintermediaten sowie über *In vitro*-Experimente sind in *N. tabacum* zwei Replikationsursprünge (*origins of replikation, ori*) bestimmt worden (Kunnimalaiyaan et al. 1997; Kunnimalaiyaan & Nielsen 1997). *OriA* liegt bei *N. tabacum* im *trnI*(GAU)-Intron und besteht aus 82 bp inklusive Schleifensekundärstruktur und einer direkten Sequenzwiederholung. Diese Minimalsequenz ist bei *C. reflexa* bis auf einen Basenaustausch und eine Basendeletion identisch mit der entsprechenden Sequenz aus *N. tabacum* (Abb. 17). Der zweite Replikationsursprung (*oriB*) liegt

bei *N. tabacum* im *orf350*- bzw *ycf1*-Gen. Das Gen *orf350* fehlt in *C. reflexa*; erst die vollständige Sequenzierung des *ycf1*-Genes wird zeigen, ob auch *oriB* vorhanden ist.

C. reflexa AGATCCAATGTAGATCCAACCTTCGA-TCACTCGTGGGATCCGGGCGGTCGGGAGGGACCACCACGGCTCCTCTCTCTCG 81
N. tabacum AGATCCAATGTAGATCCAACCTTCGATTCACCTCGTGGGATCCGGGCGGTCGGGGGGACCACCACGGCTCCTCTCTCTCG 82

Abbildung 17 Basenvergleich der 82 bp langen Minimalsequenz des *oriA* aus *C. reflexa* und *N. tabacum*. Direkte Sequenzwiederholungen sind durch schwarze Striche unterhalb der Sequenz hervorgehoben. Die langen Pfeile oberhalb der Sequenz kennzeichnen einen „Stem/Loop“-Struktur bildenden Bereich.

Deletionen im *psbD*-Promotor

Deletionen innerhalb des Plastidenchromosoms von *C. reflexa* betreffen nicht nur kodierende Sequenzen, sondern sind auch in den intergenischen Bereichen oder Promotorregionen von Genen zu finden. Zum Beispiel ist die Länge des 5'UTR-Bereiches des *psbD/psbC*-Operons in *C. reflexa* im Vergleich zu dem Bereich in *N. tabacum* um 446 bp verkürzt (Abb. 18). Einer der PEP-Promotoren, der in *N. tabacum* an der Stelle –550 bp vor dem Translationsstart liegt, ist in *C. reflexa* nicht erhalten. Anders verhält es sich mit der Promotorsequenz des lichtinduzierten PEP-Promotors. Die Sequenzen „AAGT“ und „GACCT“, die von einem durch den Blaulichtrezeptor aktivierten Proteinkomplex (activating complex, AGF) gebunden werden (Kim & Mullet 1995) und der zugehörige PEP-Promotor sind in *C. reflexa* hochkonserviert (Abb. 19), was auf eine funktionale Photoinduktion der *psbD/psbC*-Transkription hindeuten könnte.

4 Ergebnisse

	<u>'AAGT'</u>	<u>'GACCT'</u>	<u>'-35'</u>				
<i>C. reflexa</i>	AGAAATCAAA	CAAATAAAAA	GTAAGTGGAC	CTAACCCATT	GAATCATGAC	TCGATCTGCT	60
<i>N. tabacum</i>	AGAAATCAAC	AAAAGAAAAA	GTAAGTGGAC	CTGACCATT	GAATCATGAC	TATATCCGCT	60
	<u>'-10'</u>						
<i>C. reflexa</i>	ATTC TGATAT	TCAAA-----	-----	-----	-----	-----	75
<i>N. tabacum</i>	ATTC TGATAT	TAAAATTCGA	TAGAGATGAA	ATTGGAGCAG	TTGATTTTTT	TTTAATTTCA	120
<i>C. reflexa</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	75
<i>N. tabacum</i>	TTTTTTTGTT	TTGGATTCCA	CAAGAATTGG	TCGATATTTT	CGATTAAATC	TTCTTGTTAC	180
<i>C. reflexa</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	75
<i>N. tabacum</i>	TAGATTTTCT	ATAGGAAAAA	TTATAGGAAT	AAATTGTTAT	TCCTTTCCTC	TACAGAGAAA	240
<i>C. reflexa</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	75
<i>N. tabacum</i>	CCTTTCTTCC	AAGTCACACC	ATAAGAGCCA	TTTATTATCT	TTCTTTGATF	CCAGATCAAA	300
<i>C. reflexa</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	75
<i>N. tabacum</i>	GATTAATTTT	ATCATTAAAT	TCTATCTAGA	TTATATATCT	ATATTATATF	AAGTAGATTG	360
<i>C. reflexa</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	75
<i>N. tabacum</i>	TAGATTTTCG	TGTATATCTA	TCAGATCGTG	GCTTCATGTA	CCAAATATTT	CAATATCGTT	420
<i>C. reflexa</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	75
<i>N. tabacum</i>	GCATCCGGTA	TTTTTGTTTT	GTTCCAACAG	TGTGATGAAG	AATAGATCCG	AGAAAGAGAC	480
				<u>'-35'</u>			
<i>C. reflexa</i>	-----	-----	-----	-----	-TAAAATTAT	CGATAGATTC	94
<i>N. tabacum</i>	TTTCATTTTC	AGTCTCTTAT	TTATTTTATF	TTATTGAAAT	TTTCGATTTT	CTAAAAGGAA	540
	<u>'-10'</u>						
<i>C. reflexa</i>	CATTTAAAAAT	TTAAAGAGTT	CTAATTAATG	TAATGAGTAT	ACATATAA-A	A--TAAATGA	151
<i>N. tabacum</i>	AATCTAAAAG	GAAAAATAGT	AGATTATCTC	TTTTTCTAAC	AGATAAAAGA	ATCTAAAAAT	600
<i>C. reflexa</i>	GAATAATGTT	TCTGAA--TC	TCACGAAC-A	AGATCTAAGA	ATAACTTTAG	TTACTGGAAT	208
<i>N. tabacum</i>	AAATATTCGA	TCGAACGTGC	TTTTTTCCCT	CGATCCGTGG	AAAGATATA-	CT-CTGG---	655
<i>C. reflexa</i>	GGGAATAAAT	CTCAAGATCC	GCGGTATTGA	GAGGGAGTAT	CACTTGGTCC	TGGAACAGTT	268
<i>N. tabacum</i>	GGTTTATAGAT	TTATTTATAT	GAAGTATGAA	GGAAAGGGAT	CGCTTGGTCC	TTGAAGAGTT	715
				<u>'-35'</u>		<u>'-10'</u>	
<i>C. reflexa</i>	TTTTTTTTTT	CAAAAAAGGA	ATCTATCTGA	TTGAATTGGC	ATTAA-----	GAATAAT---	320
<i>N. tabacum</i>	CTTTCAAAAC	----AAAGGA	TTGA-----	TTGAATTGTC	TTATTAGGAC	AATTAATGGT	765
<i>C. reflexa</i>	-----	----AAAAAG	AAGAATCCAA	CTGAGTTCAT	GGATTTCCCT	AGG-CAATTT	365
<i>N. tabacum</i>	TCATATGCTT	AGTCAGAAGG	AATAATCCAA	TGGAGTTCAT	GGATTTACCT	AGGTCAGTTT	825
<i>C. reflexa</i>	AGGGGCCAAT	CACTAAAATA	TGTTAAAAAT	CTTTTGATCT	TCGAAACCCA	GAGTAAGGGA	425
<i>N. tabacum</i>	ATGGGCTAAT	CAATAAAG--	-----C	ATTTTTATCT	TCGAAACCCA	TTGGAAGGG	874
<i>C. reflexa</i>	CATTTCAAGA	TAAATAATAC	CGCATTTTTC	TTGAATATTC	AAATCTCCCG	AAAATGCTCT	485
<i>N. tabacum</i>	CAGTGCAAGA	GAAATCATAC	AAAAATGATC	--GAATCTTC	GGACGCCCCG	AAAAAGATAT	932
<i>C. reflexa</i>	CAGGTGCTCG	GAAATGGTCG	AAGTAGTTTA	ATAGGAGGAT	CACTATG	532	
<i>N. tabacum</i>	GAGGTGCTCG	GAAATGGTCG	AAGTAGTTGA	ATAGGAGGAT	CACTATG	979	

↑
start *psbD*

Abbildung 18 Vergleich des *psbD* 5'-nichttranslatierten Bereiches von *C. reflexa* mit *N. tabacum*. Schwarze Balken über der Sequenz geben konservierte Sequenzen des Promotorbereiches an. Die mit „AAGT“ und „GACCT“ gekennzeichneten Sequenzen kennzeichnen die Erkennungsregionen des durch Blaulicht aktivierten Proteines. „-35“ und „-10“ kennzeichnen die Erkennungssequenzen des PEP-Promotors. Der Pfeil kennzeichnet das Startkodon des *psbD*-Gens.

4 Ergebnisse

	'AAGT'	'GACCT'	'-35'	'-10'
<i>C. reflexa</i>	ATAAAAAGTAAGTGGACCTAACCCAT	TGAATCATGACTCG	ATCTGCT	ATTCTGATATTCAA
<i>N. tabacum</i>	AGAAAAAGTAAGTGGACCTGACCTATTGAAT	CATGACTAT	ATCCGCT	ATTCTGATATTAA
<i>H. vulgare</i>	GCATAAAGTAAGTAGACCTGACTCCTTGAAT	GATGCCCT	ATCCGCT	ATTCTGATATATA
<i>A. thaliana</i>	AGAAAAAGTAAGTGGACCTAACCCATCGAA	TATGACTAT	ATCCACT	ATTCTGATATTCAA

Abbildung 19 Vergleich des durch einen blaulicht-abhängigen Faktor regulierten *psbD*-Promotors von *C. reflexa* mit Sequenzen anderer Pflanzen. Nukleotidsequenz des *psbD*-Promotors aus *C. reflexa* wurde mit *N. tabacum* (Wakasugi et al. 1998), *H. vulgare* (Sexton et al. 1990) und *A. thaliana* (Hoffer & Christopher 1997) verglichen.

Deletionen im *rpl32*-Promotor

Das plastidäre Gen *rpl32* kodiert bei *N. tabacum* das Protein CL32 der großen Unterheit der 70S Ribosomen (Yokoi et al. 1990). Die zwei Transkriptionsstarts (P1 und P2) des Genes sind in dem kodierenden Bereich des *ndhF*-Genes lokalisiert, welches vor *rpl32* auf dem komplementären Strang liegt. In photosynthetisch aktiven Plastiden wird die Transkription des Genes am PEP-Promotor P1 initiiert, in photosynthetisch inaktiven Geweben vom NEP-Promotor P2 (Vera et al. 1992; Vera et al. 1996). In *C. reflexa* ist das *ndhF*-Gen vor dem *rpl32*-Gen deletiert. Ein Vergleich der Aminosäuresequenz des Proteins mit der von *N. tabacum* zeigt, daß das Protein in seiner Sequenz noch relativ vollständig, jedoch um drei Aminosäuren kürzer ist, als das Tabakprotein (Abb. 20). Dieses könnte darauf hinweisen, daß das Protein entweder nicht mehr funktionell in *C. reflexa* ist, oder das Gen von einem bisher nicht identifizierten Promotor transkribiert wird, der stromaufwärts der bereits beschriebenen Promotoren liegt (Vera et al. 1992).

<i>N. tabacum</i>	MAVPKRRSTSTSKKRIRKNIWKRKGYSIALKAFSLAKSLSTGNSKSFVFRQTKINK*
<i>C. reflexa</i>S.K.....G..T..I.SLWTT.....V...L...L...L..CTIN.*

Abbildung 20 Aminosäuresequenzvergleich des Proteines *rpl32* aus *N. tabacum* und *C. reflexa*. Homologe Bereiche sind durch einen (.) , Stopkodons durch einen (*) gekennzeichnet.

4.2.3 Struktur des Plastidenchromosoms

Die Abbildung 21 vergleicht die Struktur des Plastidenchromosoms der grünen Art *C. reflexa* mit der von bekannten Plastidenchromosomen aus unterschiedlichen Pflanzengruppen. Hierbei wird deutlich, daß hauptsächlich die Einzelkopieregionen (*LSC* und *SSC*) der Chromosomen von Deletionen betroffen sind und die Bereiche der *IR* augenscheinlich die am konserviertesten Bereiche des Chromosoms darstellen. Da in der *LSC*-Region die meisten Photosynthesegene, Gene der Chlororespiration und der Untereinheiten der plastidär kodierten Polymerase lokalisiert sind, ist die Reduktion dieses Bereiches auf den Verlust dieser Gengruppen zurückzuführen.

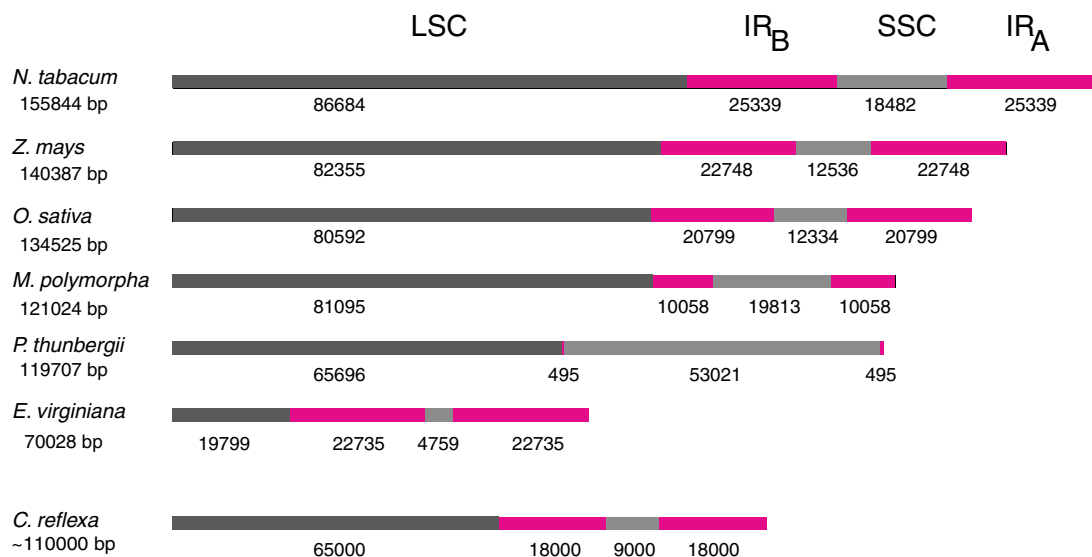


Abbildung 21 Schematische lineare Darstellung der Plastidenchromosome verschiedener Pflanzenarten im Größenvergleich. Zwei Bereiche mit einmalig vorkommenden Genen (*large* und *small single copy region* / *LSC* und *SSC*) werden von zwei gegenläufigen Sequenzwiederholungen getrennt (*inverted repeat A* und *B*; *IR_A* und *IR_B*). Die Nummern unterhalb der DNA-Segmente geben die Länge in Basenpaaren an. Dunkelgraue Bereiche = *LSC*, hellgraue Bereiche = *SSC*, rote Bereiche = *IR_A* und *IR_B*.

Genumordnungen

An mehreren Stellen des Plastidenchromosoms von *C. reflexa* ist es zu Umordnungen im Vergleich zur Genabfolge auf dem Plastidenchromosom von Tabak gekommen. Dieses führte dazu, daß einzelne Gene oder ganze Gengruppen nun an einer anderen Stelle des Plastoms liegen oder auf dem gegenüberliegenden Strang kodiert werden.

Die Abbildung 22 dokumentiert die Deletion eines 10 kb großen Fragmentes im Bereich *rbcL-rps18* in der Sequenz von *C. reflexa*. Da die in diesem Bereich lokalisierten Gene, z.B. *accD* oder das Operon *psbE-J*, durch *Southern Blot*-Analyse und PCR nachgewiesen werden konnten (nicht gezeigt), sind sie offensichtlich an einer anderen Stelle des Plastomes lokalisiert.

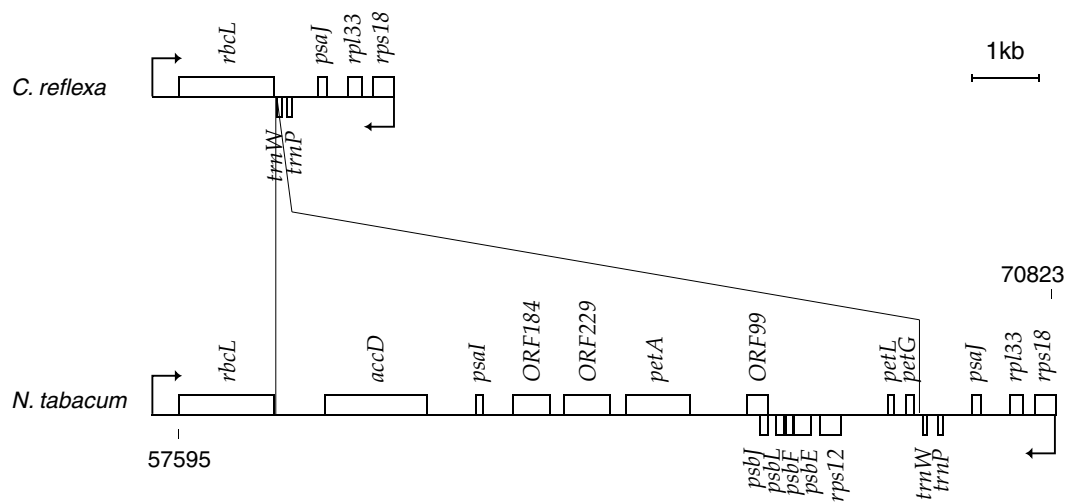


Abbildung 22 Vergleich des DNA-Bereiches *rbcL-rps18* aus *C. reflexa* mit der entsprechenden Region aus *N. tabacum*. Die Zahlen an den Enden des Diagramms geben die Lage der Gene auf dem Plastidenchromosom von *N. tabacum* an. Die Pfeile zeigen die Transkriptionsrichtung.

Inversionen

Die Abbildung 23 zeigt die Promotorregion des *psbD*-Genes mit stromaufwärts liegenden Genen von *C. reflexa* im Vergleich zu *N. tabacum*. Interessanterweise ist es bei den stromaufwärts liegenden Genen in *C. reflexa* zu einer Inversion in der Anordnung der Gene gekommen. Die Gene *trnC* und *petN*, die ein Operon bilden und in *N. tabacum* auf demselben Strang angeordnet sind wie das *psbD/psbC*-Operon, liegen in umgekehrter Reihenfolge auf dem gegenüberliegenden Strang.

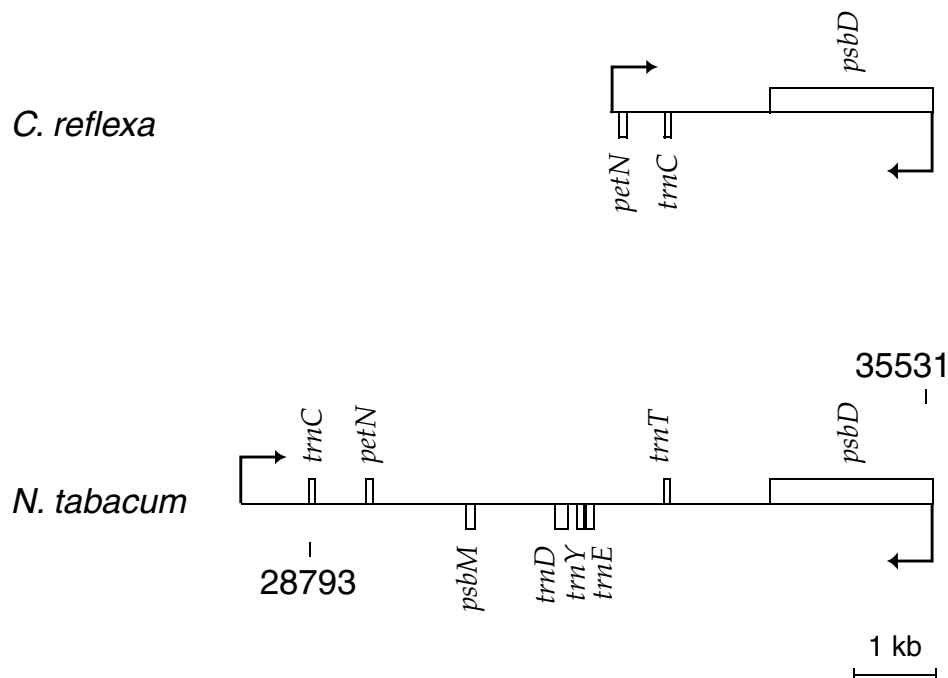


Abbildung 23 Vergleich des Bereiches *trnC-psbD* aus *C. reflexa* mit der entsprechenden Region aus *N. tabacum*. Die Zahlen an den Enden des Diagramms geben die Lage der Gene auf dem Plastidenchromosom von *N. tabacum* an. Die Pfeile zeigen die Transkriptionsrichtung.

4.3 Vergleichende Untersuchung der Gengehalte der Plastidenchromosome verschiedener Arten von *Cuscuta*

Da die Sequenzierung der noch vorhandenen Lücken im Plastidenchromosom von *C. reflexa* sich als außerordentlich schwierig erwies, wurde versucht, die Informationen über den Gengehalt durch *Southern Blot*-Analysen zu ergänzen. In diese Analyse wurden auch zwei weitere *Cuscuta*-Arten, die intermediäre Art *C. gronovii* und die weiße Art *C. odorata* mit einbezogen, um Ähnlichkeiten sowie Unterschiede zwischen den drei Arten herauszuarbeiten.

4.3.1 Größenabschätzung der pDNA untersuchter *Cuscuta*-Arten im Vergleich zur pDNA von *N. tabacum*

Durch sukzessive Hybridisierung eines Nylonfilters, auf dem das gesamte Plastidengenom von *N. tabacum* immobilisiert wurde (Sugiura et al. 1986), mit radioaktiv markierter, angereicherter Plastiden-DNA von *C. reflexa*, *C. gronovii* und *C. odorata*, wurde das Ausmaß der Deletionen im Plastidenchromosom abgeschätzt (Abb. 24). Um eine bessere Auflösung der einzelnen Abschnitte des Plastidenchromosoms zu erhalten, wurden die rekombinanten pDNA-Klone außer mit dem Restriktionsenzym *Bam*HI zusätzlich mit dem Enzym *Eco*RI geschnitten. Ein nicht von den pDNA-Klonen repräsentierter Bereich wurde mittels PCR amplifiziert und wie die Klone behandelt. Da in den untersuchten *Cuscuta*-Arten verschiedene Typen von Plastiden vorlagen, in *C. reflexa* und *C. gronovii* hauptsächlich Chloroplasten, in *C. odorata* Amyloplasten, wurden unterschiedliche, artspezifische Plastidenisolierungsprotokolle verwendet (s. 3.11).

Die Abbildung 24 zeigt die Autoradiogramme, die nach der Hybridisierung von gesamter plastidärer DNA aus den verschiedenen *Cuscuta*-Arten mit einem das Tabakplastom repräsentierenden Filter erhalten wurden. Während das Plastidenchromosom von *C. reflexa* mit der größten Anzahl von Fragmenten der Tabak-pDNA hybridisiert, ist diese Anzahl in *C. gronovii* schon geringer und in der weißen, photosynthetisch inaktiven Art *C. odorata* hybridisieren nur sehr wenige Fragmente. In Abbildung 25 ist eine grobe Zuordnung der auf den mit *C.odorata* hybridisierenden Fragmenten liegenden Genen gezeigt. Die darauf liegenden Gene umfassen vor allem ribosomale RNAs und tRNAs aber auch proteinkodierende Gene wie *clpP*.

4 Ergebnisse

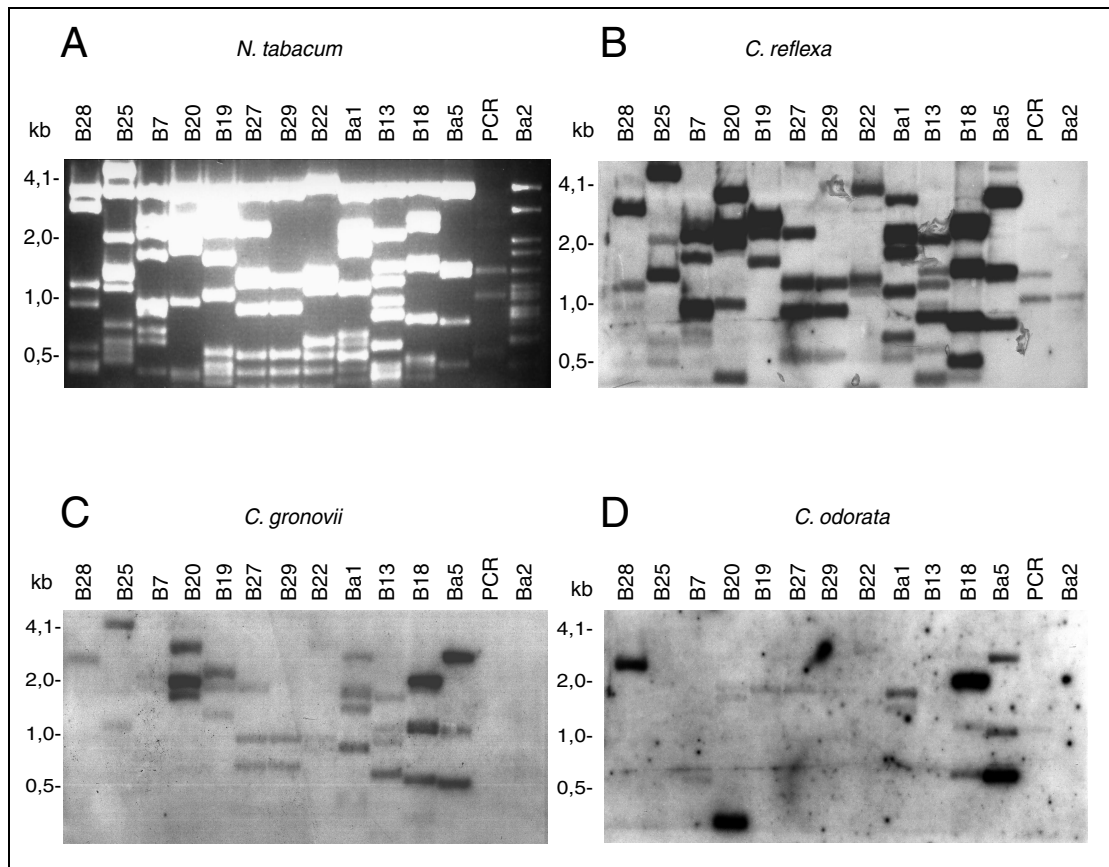


Abbildung 24 Größenabschätzung des Kodierungspotentials des Plastidengenoms verschiedener *Cuscuta*-Arten durch Hybridisierung mit pDNA-Fragmenten, die zusammen das gesamte Plastidengenom von *N. tabacum* repräsentieren. Subklone des ptGenoms aus *N. tabacum* (Sugiura et al. 1986) wurden mit *Bam*HI und *Eco*RI verdaut und in 1,2%-igen Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt. Der nicht von diesen Fragmenten repräsentierte Abschnitt des plastidären Genoms wurde mit Hilfe spezifischer Oligonukleotide (s. 3.4) über PCR amplifiziert und wie die Plasmide behandelt. (A) Gel mit den durch Ethidiumbromid angefärbten DNA-Fragmenten. (B)–(D) Autoradiogramme nach Hybridisierung (s. 3.16.4) mit angereicherter, radioaktiv markierter pDNA aus *C. reflexa*, *C. gronovii* und *C. odorata*. Der gleiche Filter wurde für alle drei Hybridisierungen verwendet, und die pDNA-Sonde dazu jeweils nach Autoradiographie abgewaschen. Die Größen von Fragmenten eines DNA-Standards sind auf der linken Seite angegeben.

Das Hybridisierungsmuster von *C. gronovii* ähnelt dem von *C. odorata*, es werden in *C. gronovii* jedoch noch zusätzliche Fragmente aus anderen Bereichen des Plastomes detektiert, die auf den Klonen B20, B19, B27, B22, Ba1 und B13 liegen. Gene, die auf diesen Fragmenten liegen, sind z.B. Photosynthesegene, wie *psaA*, *psaB*, *psbC*, *psbD*, *rbcL* und ribosomale Proteine, wie *rpl16*, *rpl14*, *rps8*, *rpl33*, *rps18*, *rps3*, *rpl22* und *rps19*.

Die Bereiche der IR enthalten Gene, die an der plastidären Genexpression beteiligt sind, z.B. *rrn5*, *rrn4,5*, *rrn16*, *rrn23* und sind in allen drei Arten in ihrer Größe stark konserviert. Im Bereich der SSC-Region sind in Höheren Pflanzen hauptsächlich *ndh*-Gene lokalisiert (Klon Ba2 und Abb. 5). Diese Gene sind in *C. reflexa* zu Pseudogenen degradiert oder deletiert worden (Haberhausen & Zetsche 1994). Ein Vergleich zwischen *N. tabacum* und *C. reflexa* zeigt, daß dieser Bereich mit ca. 9 kb in *C. reflexa* nur noch halb so groß. Auch in *C. gronovii* und *C. odorata* hybridisieren diese Bereiche nicht.

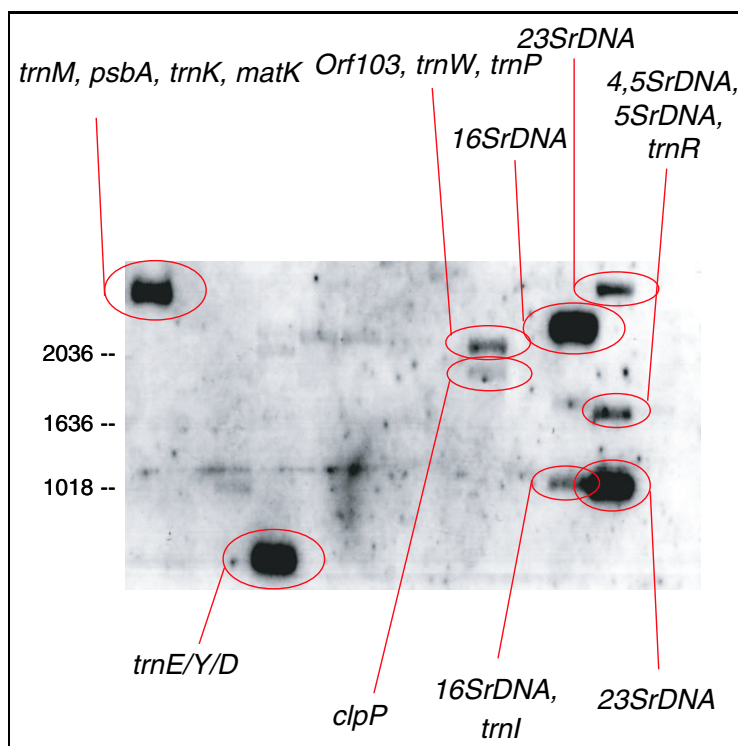


Abbildung 25 Zuordnung der Hybridisierungssignale von *C. odorata* zu Genabschnitten auf dem Plastidenchromosom von *N. tabacum*.

4.3.2 Analyse einzelner pDNA-Bereiche

Eine detaillierte Analyse der einzelnen *Bam*HI-Klone ermöglicht die genaue Zuordnung von plastomkodierten Genen zu den einzelnen Fragmenten bzw. Hybridisierungssignalen. An einigen Klonen wird die Reduktion des Plastidenchromosoms unter den untersuchten Arten besonders gut sichtbar und wird im Folgenden beispielhaft erläutert (Abb. 26–28).

Der Klon B20 verdeutlicht mehrere wichtige Beispiele für Gendelektionen innerhalb des Plastidenchromosoms der drei Arten (Abb. 26). Das auf Fragment 1 gelegene *rpoB*-Gen hybridisiert nur in *C. reflexa*, nicht jedoch in *C. gronovii* und *C. odorata*. Dieses bestätigt die Ergebnisse des Verlustes der *rpo*-Untereinheiten und somit einer funktionsfähigen PEP in intermediären und weißen *Cuscuta*-Arten (Krause et al. 2003). Wichtige Photosynthesegene wie *psbD*, *psbC*, *psaB* und *psaA*, die auf den Fragmenten 6,7,8 und 9 lokalisiert sind, hybridisieren in *C. reflexa* und *C. gronovii*. In *C. odorata* sind schwache Signale für die auf den Fragmenten 8 und 9 gelegenen Gene *psaB* und *psaA* zu finden. Dieses könnte darauf hindeuten, daß diese Gene in dieser Art als stark veränderte Pseudogene vorliegen.

Der Klon B28 enthält Gene des *IR* und Teile der *Large single copy region* (Abb. 27). Auffällig ist das Fragment 10, welches neben dem *trnH*-Gen das *psbA*-Gen enthält. Dieses Fragment wird in allen drei *Cuscuta*-Arten, einschließlich der weißen Art *C. odorata* detektiert. Es ist zu vermuten, daß das Signal in der weißen Art auf das *trnH*-Gen zurückzuführen ist und das *psbA*-Gen wahrscheinlich als Pseudogen vorliegt. *trnK* und *rpl2* sind in *C. reflexa* deletiert (Bömmer et al. 1993) und wahrscheinlich somit auch in den anderen beiden Arten.

Die Fragmente des Klons Ba5 (Abb. 28) enthalten Gene des *IR* wie die ribosomalen Gene *rrn23*, *rrn4.5* und *rrn5*. Bis auf das Fragment 4 des Klones können alle anderen Bereiche in allen untersuchten *Cuscuta*-Arten detektiert werden.

Eine entsprechende Analyse sämtlicher Klone findet sich im Anhang (s. A.1)

4 Ergebnisse

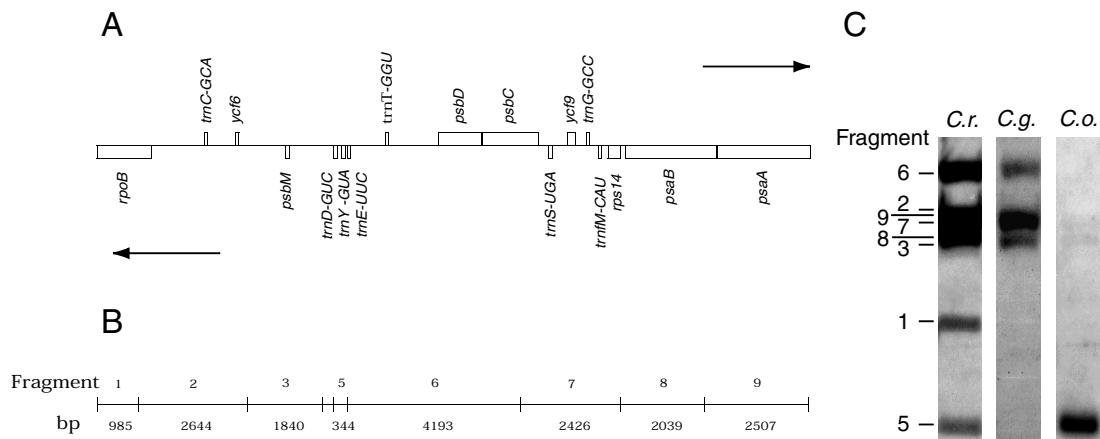


Abbildung 26 Restriktionskarte und *Southern Blot*-Analyse des pDNA-Subklons B20 aus *N. tabacum*. (A,B) Schematische Darstellung der Lage der Gene und der Lage und Größe der Restriktionsfragmente, die mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Eco*RI erhalten wurden. Die Pfeile geben die Transkriptionsrichtung an. (C) *Southern Blot*-Analyse der pDNA von *C. reflexa* (C.r.), *C. gronovii* (C.g.) und *C. odorata* (C.o.). Neben den Autoradiogrammen sind die Nummern der Restriktionsfragmente angegeben.

4 Ergebnisse

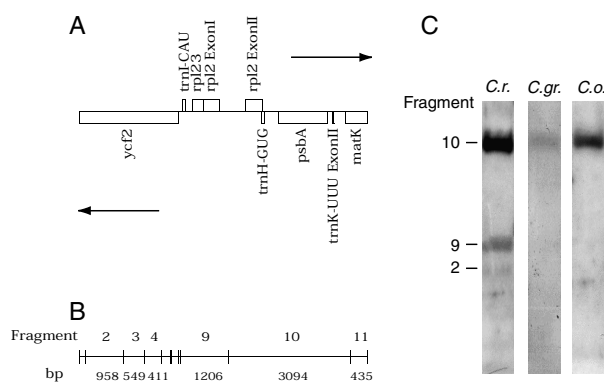


Abbildung 27 Restriktionskarte und *Southern Blot*-Analyse des pDNA-Subklons B28 aus *N. tabacum*. (A,B) Schematische Darstellung der Lage der Gene und der Lage und Größe der Restriktionsfragmente, die mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Eco*RI erhalten wurden. Die Größe der Restriktionsfragmente ist angegeben. Die Fragmente wurden von 1 bis 11 durchnummeriert, wobei Fragmente unter einer Größe von 400 bp der Übersicht halber weggelassen wurden. Die Pfeile geben die Transkriptionsrichtung an. (C) *Southern Blot*-Analyse der pDNA von *C. reflexa* (*C.r.*), *C. gronovii* (*C.g.*) und *C. odorata* (*C.o.*). Neben den Autoradiogrammen sind die Nummern der Restriktionsfragmente angegeben.

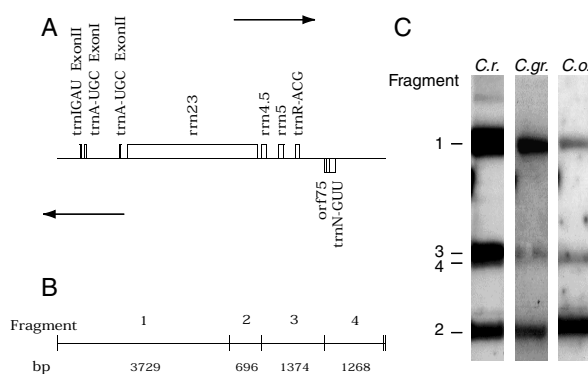


Abbildung 28 Restriktionskarte und *Southern Blot*-Analyse des pDNA-Subklons Ba5 aus *N. tabacum*. (A,B) Schematische Darstellung der Lage der Gene und der Lage und Größe der Restriktionsfragmente, die mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Eco*RI erhalten wurden. Die Pfeile geben die Transkriptionsrichtung an. (C) *Southern Blot*-Analyse der pDNA von *C. reflexa* (*C.r.*), *C. gronovii* (*C.g.*) und *C. odorata* (*C.o.*). Neben den Autoradiogrammen sind die Nummern der Restriktionsfragmente angegeben.

4.3.3 Analyse der Plastidengene *accD* und *clpP*

Hybridisierungen von genomischen *Southern Blot*-Filtern mit genspezifischen Sonden aus *N. tabacum* für die plastidären Gene *accD* und *clpP* zeigten, daß das *accD*-Gen in allen drei untersuchten *Cuscuta*-Arten und in *N. tabacum* vorhanden ist. Das *clpP*-Gen zeigt nur ein eindeutiges Signal in der nicht-parasitischen Pflanze *N. tabacum*, die als Kontrollpflanze verwendet wurde (Abb. 29). Die für den *Southern Blot* verwendete Gesamt-DNA, wurde zuvor anhand eines „Dot blot“-Filters, der mit der Sonde des *rrn16*-Genes hybridisiert wurde, auf gleiche Mengen an plDNA abgeglichen (Krause et al. 2003).

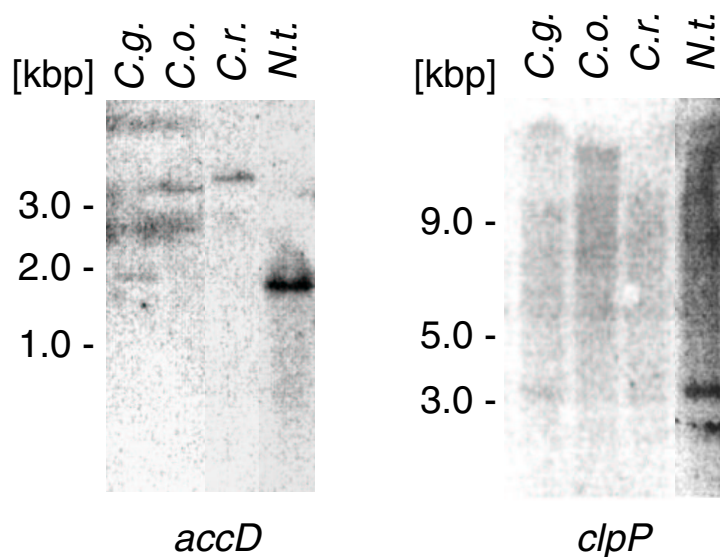


Abbildung 29 *Southern Blot*-Analyse der Gene *accD* und *clpP*. Genspezifische Sonden wurden radioaktiv markiert und mit *Southern Blot*-Filtern hybridisiert, auf welchen *EcoRI/XhoI*-geschnittene DNA der drei untersuchten *Cuscuta*-Arten und von *N. tabacum* immobilisiert war. Neben den Autoradiogrammen sind die Fragmentgrößen eines DNA-Standards angegeben.

4.4 Vergleich der Transkriptmuster in Plastiden verschiedener *Cuscuta*-Arten

Die plastidären Transkriptmuster einer Pflanze geben Auskunft darüber, welche Arten von RNAs in den Plastiden zum Zeitpunkt der RNA-Isolierung gerade vorliegen. Zur Analyse der plastidären Transkriptmuster wurden die 3'-Enden isolierter Gesamt-RNA mit pCp durch die T4-RNA-Ligase markiert. Die so markierte RNA wurde als Sonde zur Hybridisierung mit DNA-Fragmenten eingesetzt, die das gesamte Tabakplastom repräsentieren (s. 4.3.1).

Auffällig ist, daß sich die Transkriptmuster, trotz der Unterschiede im Kodierungspotential der pDNA der drei untersuchten *Cuscuta*-Arten (4.3.1), sehr ähneln (Abb. 30). Die Transkriptmuster von *C. gronovii* und *C. odorata* ähneln in ihrem Hybridisierungsmuster außerdem sehr stark den Hybridisierungsmustern, die mit angereicherter pDNA als Sonde erhalten wurden (Abb. 24). Anders ist der Fall im Transkriptmuster von *C. reflexa*. Hier zeigt es sich, daß weniger Transkripte stabil vorliegen als aufgrund des Kodierungspotentials dieser Art möglich wäre (Abb. 24).

Einige Transkripte des plastidären Chromosoms werden in allen drei Arten sehr stark stabilisiert, so z.B. die tRNAs *trnE*, *D* und *Y*, die auf einem 344 bp großen Fragment des Klonen B20 lokalisiert sind. Dieses Fragment hybridisiert nicht mit der pDNA von *C. gronovii*, was wahrscheinlich auf ein für die Detektion zu schwaches Signal der plastidären DNA zurückzuführen ist. Die ribosomalen Transkripte *rrn4.5*, *rrn5* und der tRNAs *trnR* und *trnN* des Klonen Ba5 hybridisieren in *C. reflexa* und *C. gronovii* stark. In *C. odorata* hybridisieren diese Transkripte schwächer. Hier sind es die ribosomalen Gene *rrn23* und *rrn16*, die ein starkes Hybridisierungssignal zeigen.

Die Signalintensitäten einzelner DNA-Sonden können nicht nur auf der Hybridisierung von „sense“-RNA, sondern unter Umständen auch auf Hybridisierungen mit „antisense“-RNA beruhen, die z.B. durch fehlende Termination der Transkription entstehen kann. Um das Verhältnis von genspezifischer zu nichtgenspezifischer Transkription zu überprüfen, wurde die Gesamt-RNA der drei untersuchten *Cuscuta*-Arten mit einzelsträngigen, genspezifischen RNA-Sonden hybridisiert. Diese strangspezifische Hybridisierung bestätigt die Hybridisierungsmuster des Gesamtplastomfilters (Abb. 31). Starke Signale zeigen sich in der Hybridisierung sowohl des „sense“- als auch des „antisense“-Transkriptes der ribosomalen RNA *rrn16* und im Fall von *C. reflexa* und *C. gronovii* bei den tRNAs *trnR*, *trnS* und *trnE*, von *C. odorata* bei *trnS* (Abb. 31).

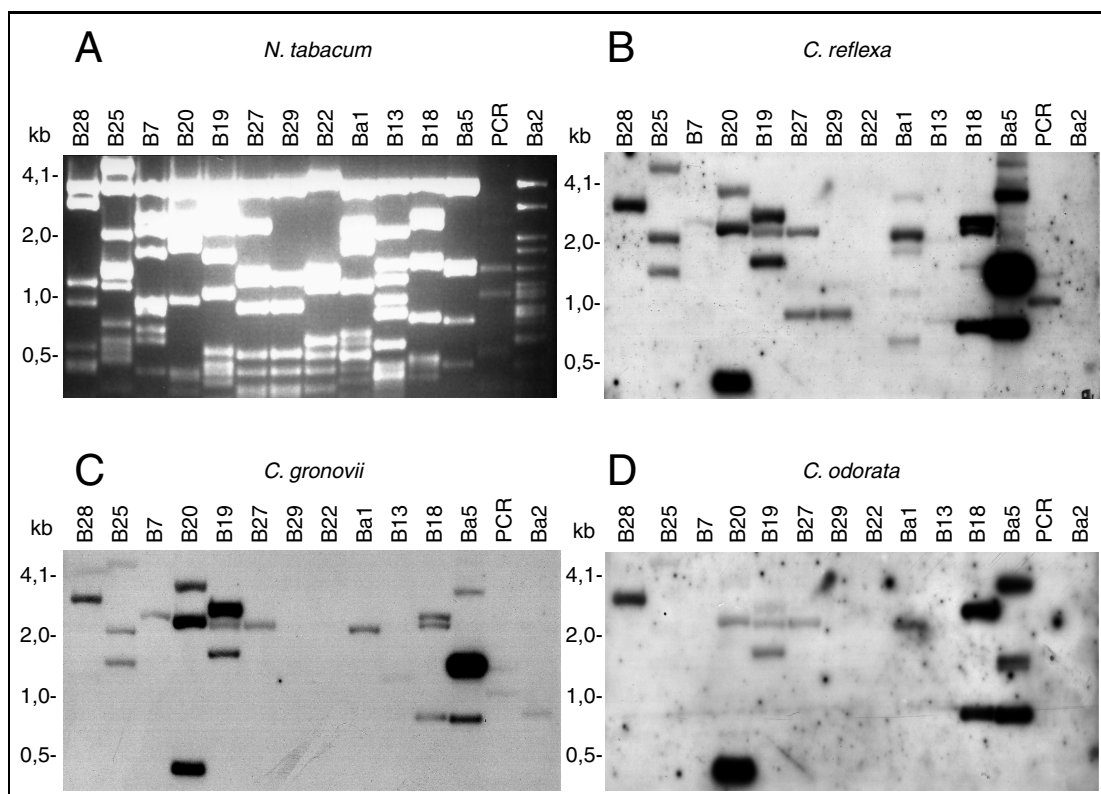


Abbildung 30 Analyse des Transkriptgehaltes der Plastiden verschiedener *Cuscuta*-Arten durch Hybridisierung mit pDNA-Fragmenten, die zusammen das gesamte Plastidengenom von *N. tabacum* repräsentieren. Subklone der pDNA aus *N. tabacum* (Sugiura et al. 1986) wurden mit *Bam*HI und *Eco*RI verdaut und in 1,2%-igen Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt. Der nicht von diesen Fragmenten repräsentierte Abschnitt des plastidären Genoms wurde mit Hilfe spezifischer Oligonukleotide (s. 3.4) über PCR amplifiziert und wie die Plasmide behandelt. (A) Gel mit den durch Ethidiumbromid angefärbten DNA-Fragmenten. (B)–(D) Autoradiogramme nach Hybridisierung (s. 3.16.4) mit radioaktiv markierter RNA aus *C. reflexa*, *C. gronovii* und *C. odorata*. Der gleiche Filter wurde für alle drei Hybridisierungen verwendet, und die gebundenen Transkripte dazu jeweils nach Autoradiographie abgewaschen. Die Größen von Fragmenten eines DNA-Standards sind auf der linken Seite angegeben.

4 Ergebnisse

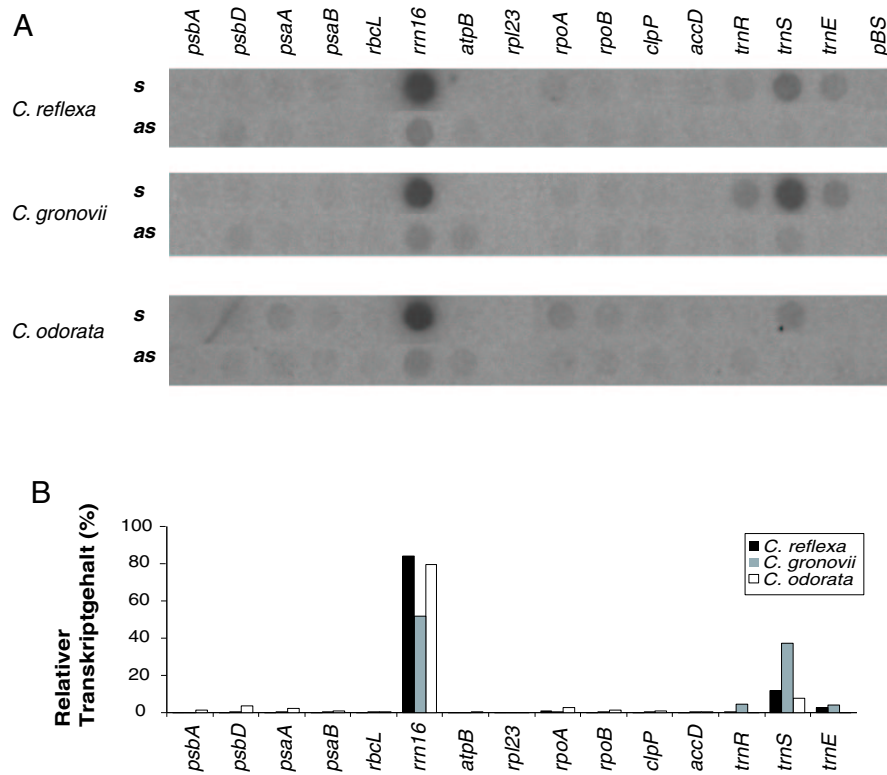


Abbildung 31 Strangspezifische Hybridisierung von *in vitro* hergestellten Transkripten mit radioaktiv markierter RNA aus *Cuscuta reflexa*, *Cuscuta gronovii* und *Cuscuta odorata*. (A) Autoradiogramme der Hybridisierungen. (B) Prozentualer Anteil an „sense“-Transkripten. Die RNA-Sonden wurden durch *in vitro*-Transkription von klonierten Plastidengen aus *N. tabacum* mit der T7- oder T3-Polymerase hergestellt (3.15.1). „as“ = nicht kodierende („antisense“)-Transkripte; „s“ = kodierende („sense“)-Transkripte.

4.4.1 Transkriptionsanalyse mit Plastiden aus *Cuscuta reflexa*

Da die vorangehenden Experimente zeigten, daß in den Plastiden von *C. reflexa* eine offensichtliche Diskrepanz zwischen dem Kodierungspotential und dem Transkriptmuster des Plastidenchromosoms herrscht, stellte sich die Frage nach der Ursache dieser Unterschiede. Um die Qualität der Transkription in den Plastiden von *C. reflexa* zu analysieren, wurden isolierte Plastiden dieser Pflanze in „Run on“-Experimente eingesetzt (3.14.3). Das nach Hybridisierung erhaltene Autoradiogramm zeigt, daß alle Regionen des vorhandenen plastidären Chromosoms gleichmäßig transkribiert werden (Abb. 32) und die Hybridisierung im wesentlichen der der DNA-Markierung entspricht (Abb. 24).

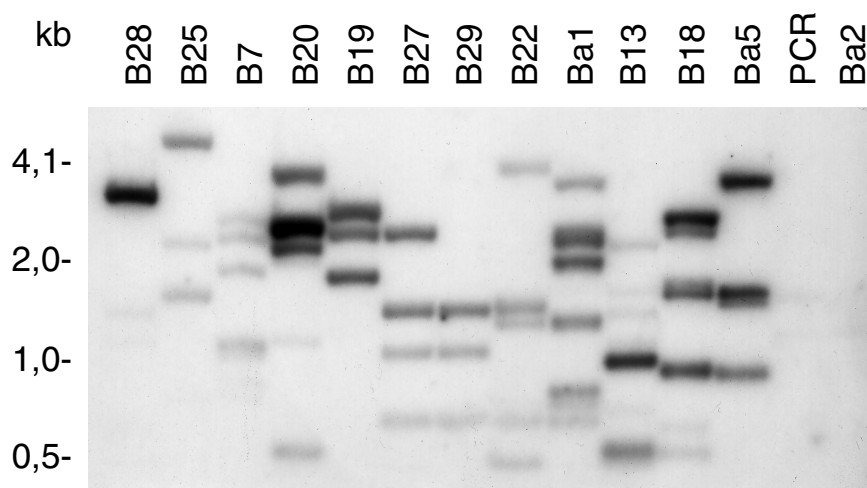


Abbildung 32 Analyse der „Run on“-Transkripte aus Plastiden von *Cuscuta reflexa* durch Hybridisierung mit pDNA-Fragmenten, die zusammen das gesamte Plastidengenom von *N. tabacum* repräsentieren. Subklone der pDNA aus *N. tabacum* (Sugiura et al. 1986) wurden wie in Abb. 24 behandelt. Gezeigt ist das Autoradiogramm nach Hybridisierung mit „Run on“-Transkripten aus Plastiden. Die Größen von Fragmenten eines DNA-Standards sind auf der linken Seite angegeben.

4.4.2 Strangspezifische Transkription

Um das Verhältnis von genspezifischer zu nichtgenspezifischer Transkription zu überprüfen, wurden auch die „Run on“-Transkripte mit einzelsträngigen, genspezifischen RNA-Sonden hybridisiert (Abb. 33).

Nach densitrometrischer Auswertung der Signale zeigt sich, daß der Anteil der Hybridisierung mit „antisense“-Transkripten zu „sense“-Transkripten insgesamt höher ist als bei Plastiden von *N. tabacum* (Krause et al. 2000). Sie übersteigt im Fall einiger Gene sogar die „sense“-Hybridisierung, z.B. beträgt das Verhältnis von *sense*- zu *antisense*-RNA für das *psbD*-Gen 0,8:1, für das *atpB*-Gen 0,2:1, für das *rpl23*-Gen 0,6:1, für das *rpoA*-Gen 0,4:1, für das *clpP*-Gen 0,7:1 und für das *accD*-Gen 0,6:1 (Abb. 33C).

4 Ergebnisse

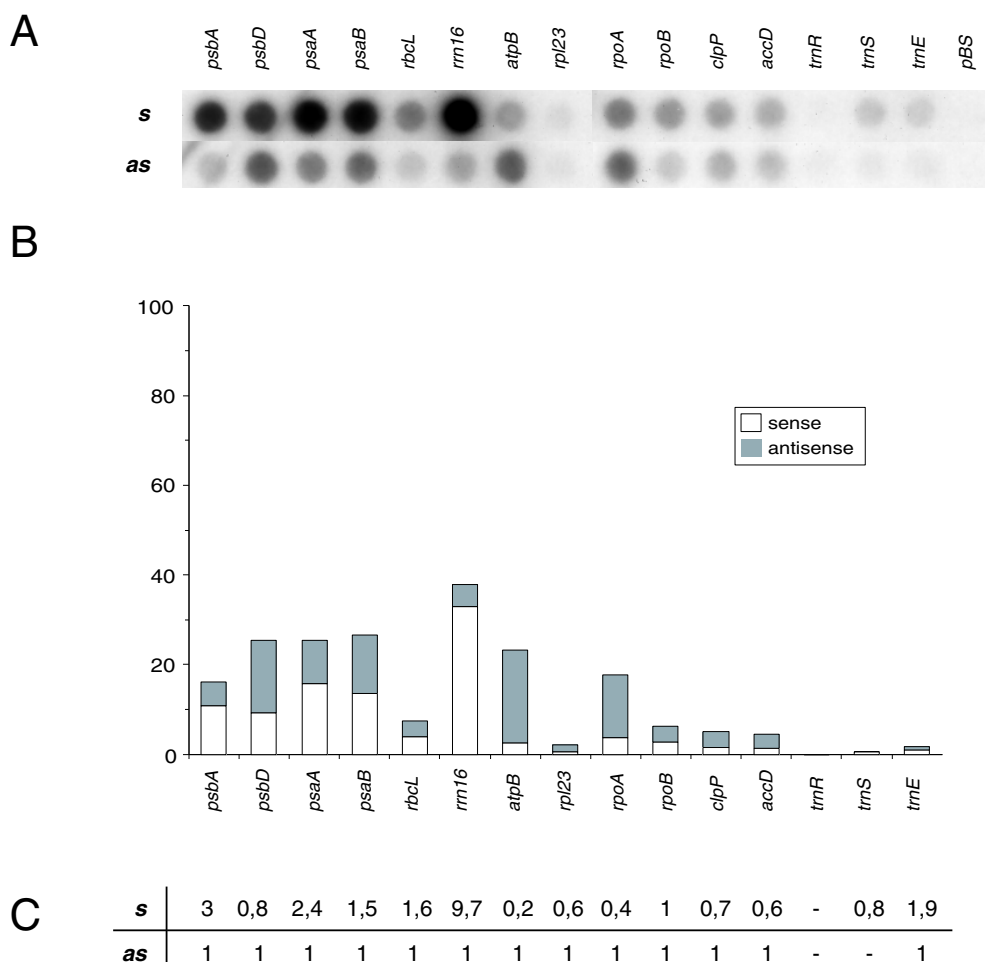


Abbildung 33 Strangspezifische Hybridisierung von „Run on“-Transkripten aus *C. reflexa*. (A) „Run on“-Transkripte (s. 3.14.3) aus Plastiden von *Cuscuta reflexa* wurden mit einem „Dot Blot“-Filter hybridisiert, auf dem genspezifische RNA-Sonden immobilisiert sind (s. 3.15.2). Die RNA-Sonden wurden durch *In vitro*-Transkription von klonierten Plastidengen aus *N. tabacum* mit der T7- oder T3-Polymerase hergestellt (s. 3.15.1). „as“ = nicht kodierende („antisense“)-Transkripte; „s“ = kodierende („sense“)-Transkripte. (B) Densitometrische Auswertung der Hybridisierungssignale. Die mit dem „FLA-5000 BioImager“ detektierten Signale wurden mit dem Programm „AIDA Image Analyzer v3.10“ (Raytest, Straubenhardt) quantifiziert (s. 3.16.6). Die Gesamtintensität der 15 Hybridisierungssignale wurde für „sense“- und „antisense“-Signale jeweils gleich 100% gesetzt. Die weißen Teile der Balken repräsentieren den Anteil der „sense“-Transkripte, während graue Balkenteile den Anteil „antisense“-Transkripte darstellen, die das jeweilige Transkript an der Gesamtintensität der Signale hat. (C) Das Verhältnis der densitometrisch ermittelten Werte von „sense“ (s) - zu „antisense“ (as) -Transkripten.

4.5 Analyse plastidärer Primärtranskripte am Beispiel des *rbcL*-Genes

In einer vorangegangenen Arbeit konnte gezeigt werden, daß die Promotorstrukturen des Genes für die ribosomale 16SrDNA in intermediären und weißen *Cuscuta*-Arten gegenüber *N. tabacum* stark verändert sind (Krause et al. 2003). An die Stelle des PEP-Promotors ist ein neuer NEP-Promotor getreten. Im Gegensatz zu Haushaltsgenen, zu denen *rrn16* gehört, wird von Photosynthese-segenen angenommen, daß ihre Expression ausschließlich von PEP abhängig ist. Daher sollte eine weitere Analyse am Beispiel des *rbcL*-Genes durchgeführt werden. Dieses Gen kommt in grünen sowie in intermediären *Cuscuta*-Arten, jedoch nicht in der weißen Art *C. odorata* vor (van der Kooji et al. 2000). Northern- und Western Blot-Analysen zeigten, daß von diesem Gen ebenfalls in allen untersuchten *Cuscuta*-Arten außer in *C. odorata* ein stabiles Transkript und Protein gebildet wird (van der Kooji et al. 2000). Die Tatsache, daß das Gen trotzdem in den Plastiden exprimiert wird, deutet darauf hin, daß eventuell andere Promotoren benutzt werden. Um dieses zu überprüfen, wurden die 5'-Enden der drei *Cuscuta*-Arten mittels *Primer-Extension-Analyse* bestimmt. Der Transkriptionsstart von *rbcL* in Tabak war bereits bekannt (Orozco et al. 1990) und diente als Kontrolle.

4.5.1 Amplifikation und Sequenzanalyse des *rbcL*-Genes in *Cuscuta*

Mit Hilfe von aus der Tabaksequenz abgeleiteten Primern wurden überlappende Fragmente des kodierenden Bereiches und des Promotorbereiches des *rbcL*-Genes in verschiedenen *Cuscuta*-Arten und in Tabak amplifiziert. Diese dienten als Grundlage der Sequenzierung. Sowohl der kodierende Bereich des Genes als auch die Promotorregion ist in *C. reflexa*, *C. gronovii* und *C. subinclusa* vorhanden, nicht aber in der chlorophyll-losen Art *C. odorata* (Abb. 34). Zur Amplifikation des *rbcL*-Promotors wurden Primersequenzen aus den Anfangsbereichen des *rbcL*-Genes und des davor liegenden *atpB*-Genes gewählt. Hier zeigte sich, daß der Promotorbereich von *C. reflexa* mit ca. 720 bp dem von Tabak entspricht, die Promotorbereiche von *C. gronovii* und *C. subinclusa* jedoch um 250 bp und 350 bp kleiner sind (Abb. 34A). Die PCR-Produkte des kodierenden Bereiches der untersuchten *Cuscuta*-Arten entsprechen in ihrer Größe den amplifizierten Fragmenten von *N. tabacum* (Abb. 34B und nicht gezeigt).

4 Ergebnisse

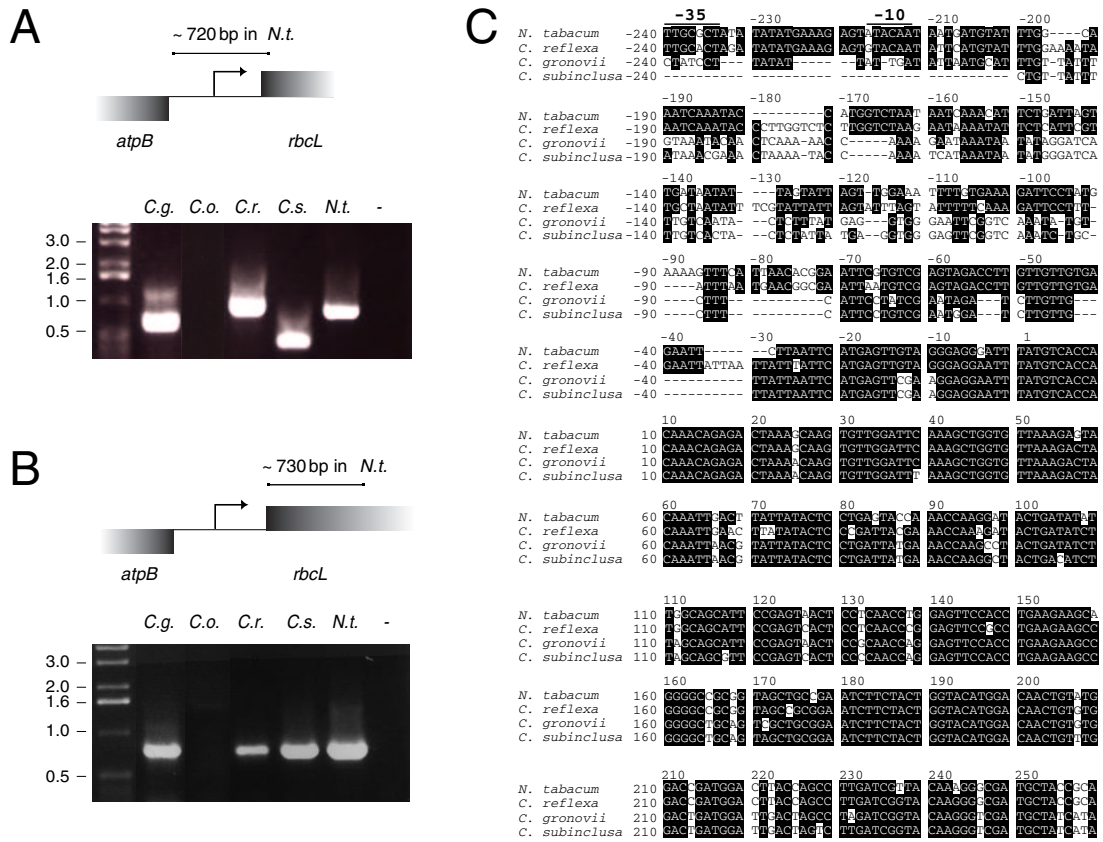


Abbildung 34 PCR und Sequenzanalyse des *rbcL*-Genes verschiedener *Cuscuta*-Arten. (A) PCR-Produkte des *rbcL*-Promotorbereiches. (B) PCR-Produkte des kodierenden Bereiches des *rbcL*-Genes. Die Fragmente wurden in 1%-igen Agarosegelen aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt. Der Größenstandard ist links aufgetragen. *C.g.* = *C. gronovii*, *C.o.* = *C. odorata*, *C.r.* = *C. reflexa*, *C.s.* = *C. subinclusa*, *N.t.* = *N. tabacum*. Über dem Elektrophoresebild ist jeweils die Länge der entsprechenden PCR-Produkte in *N. tabacum*, die Lage der verwendeten Primer und das vor dem *rbcL*-Gen liegende *atpB*-Gen schematisch dargestellt. Schattierte Boxen deuten an, daß das Gen nicht maßstabsgetreu wiedergegeben ist. (C) Sequenz des 5' Bereiches und 250 bp des kodierenden Bereiches des *rbcL*-Genes wurden verglichen. Die schwarzen horizontalen Striche über der Sequenz kennzeichnen die Position des Tabakpromotors („-10“ und „-35“) vom Typ $\sigma 70$. Die Zahlen oberhalb und neben der Sequenz geben Anzahl der Basenpaare vor (negativ) und nach (positiv) dem Startkodon an. Ein Strich (-) deutet auf ein fehlendes Nukleotid im Vergleich zur Sequenz von *N. tabacum* hin.

4 Ergebnisse

Die Sequenzen des kodierenden Bereiches von *rbcL* sind bei den untersuchten *Cuscuta*-Arten stark konserviert. Die *rbcL*-Sequenz von *C. reflexa* ist zur Sequenz von Tabak 92% homolog, die von *C. gronovii* 86% und die von *C. subinclusa* 85%. Ein Sequenzvergleich der Promotorregion des *rbcL*-Genes der drei *Cuscuta*-Arten mit *N. tabacum* zeigt, daß im Promotorbereich der untersuchten *Cuscuta*-Arten erhebliche Sequenzveränderungen stattgefunden haben. Die Sequenzlänge der *rbcL* 5'UTR von *C. reflexa* ist mit 237 bp gegenüber 216 bp etwas länger als die von *N. tabacum* („-10“ / „-35“-Promotorsequenz eingeschlossen). Auch die Basenabfolge ist in einigen Abschnitten verändert oder es sind Sequenzen inseriert. Der 5'UTR-Bereich des *rbcL*-Genes von *C. gronovii* und *C. subinclusa* ist mit 185 bp bzw. 157 bp stark deletiert und verändert. In *C. gronovii* ist die Sequenz des „-10/„-35“-Promotors, die als Erkennungsmotive für die plastidär kodierte RNA-Polymerase dient (Kapoor et al. 1997; Hess & Börner 1999), nur noch rudimentär vorhanden, in *C. subinclusa* fehlt sie völlig (Abb. 34C).

Die 5'- und 3'-Regionen des *rbcL*-Genes aus Tabak sind als transkriptstabilisierend und translationsverstärkend beschrieben worden (Shiina et al. 1998; Eibl et al. 1999; Hirose et al. 1998). Eine „Stem-/Loop“-Struktur im 5'-UTR des *rbcL*-Genes ist in phylogenetisch verschiedenen Arten Höherer Pflanzen stark konserviert (Shiina et al. 1998). Diese findet sich im 5'-UTR des Transkriptes kurz hinter dem Promotorbereich. In *C. reflexa* ist diese Sequenz rudimentär vorhanden, in den intermediären Arten *C. gronovii* und *C. subinclusa* fehlt sie. Dieses deutet darauf hin, daß das Transkript zumindest in den intermediären *Cuscuta*-Arten nicht mehr effizient stabilisiert wird (Abb. 35).

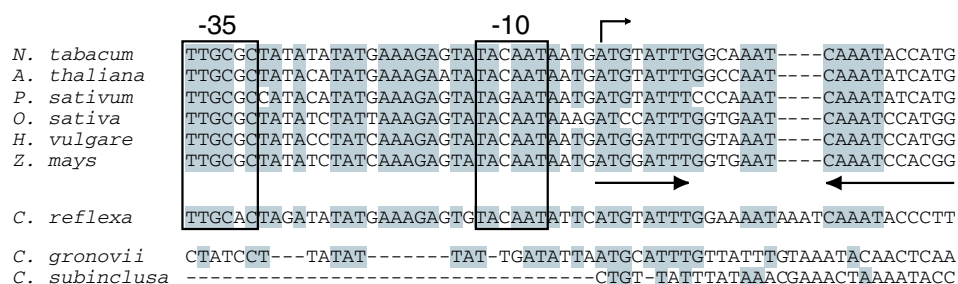


Abbildung 35 DNA-Sequenzvergleich des *rbcL*-Promotors und transkriptstabilisierender Elemente in Höheren Pflanzen und *Cuscuta*-Arten. Die Positionen der „-10“ / „-35“-Promotorelemente ist oberhalb der Sequenz angegeben. Das 5'-Ende des Transkriptes ist durch einen schwarzen Pfeil oberhalb der Sequenz angegeben. Gegenläufige schwarze Pfeile unterhalb der Sequenz geben die Lage der transkriptstabilisierenden Stem-/Loop-Struktur an.

4.5.2 5'-Enden des *rbcL*-Transkripts

Northern- und Western-Analysen zeigten, daß das *rbcL*-Gen in den untersuchten *Cuscuta*-Arten, außer in *C. odorata*, der das Gen fehlt, exprimiert und translatiert wird (van der Kooji et al. 2000). Dieses deutet darauf hin, daß Rubisco in diesen Arten ein funktionsfähiges Protein ist (Hibberd et al. 1998). In *C. gronovii* und *C. subinclusa* konnten die *rpo*-Untereinheiten der PEP nicht nachgewiesen werden (Krause et al. 2003), und der zugehörige „-10“ / „-35“-Promotor, von der aus das *rbcL*-Gen mit der PEP in Höheren Pflanzen transkribiert wird, fehlt.

Die Position des Transkriptionsstarts in *C. reflexa* wurde auf -200 bp vor Beginn der kodierenden Sequenz des *rbcL*-Genes bestimmt. Dieses Sequenzelement stimmt mit dem bereits publizierten Transkriptionsstart in *N. tabacum* überein, der auf die Position -180 bestimmt wurde (Orozco et al. 1990). Ein prozessiertes Transkriptende, welches in *N. tabacum* bei -59 bp relativ zum Beginn der kodierenden Sequenz zu finden ist, ist in *C. reflexa* nicht detektierbar. In den beiden intermediären Arten *C. gronovii* und *C. subinclusa* sind die PEP-Promotoren des Genes deletiert und *Primer-Extension*-Signale wurden an anderer Stelle gefunden. In *C. gronovii* wurde ein starkes Signal an der Stelle -108 bp gefunden. Weitere sehr schwache Signale finden sich an den Stellen -142 bp, -163 bp, -173 bp und -198 bp. In *C. subinclusa* wurde das *Primer-Extension*-Signal an der Stelle -116 bp in Relation zum ATG lokalisiert (Abb. 36, 37).

4 Ergebnisse

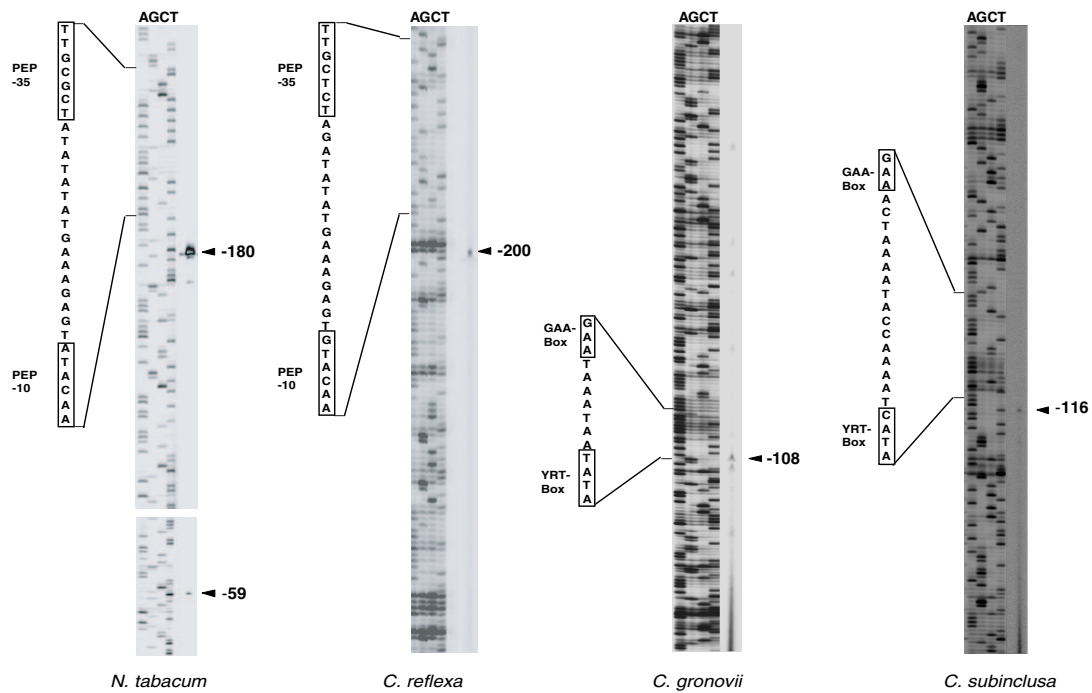


Abbildung 36 Primer-Extension-Analyse des *rbcL*-Genes. Die 5'-Enden des *rbcL*-Transkriptes wurden mit Hilfe der Primer-Extension-Methode (s. 3.14.1) analysiert und sind durch schwarz Pfeile am rechten Rand jedes Bildausschnittes sichtbar gemacht. Für die als Größenstandard dienende Sequenzreaktion und die Primer-Extension-Analyse wurde der gleiche Primer benutzt. Die Sequenzreaktion wurde neben der Primer-Extension-Analyse aufgetragen. Konsensussequenzen des *rbcL*-Promotors (PEP „-35“, „-10“) und des NEP-Promotors in den intermediären *Cuscuta*-Arten („GAA“, „YRTA“), die stromaufwärts von Primer-Extension-Signalen gefunden wurden, sind durch schwarz umrandete Boxen gekennzeichnet. Mögliche NEP-Promotorsequenzen („YRTA“) sind durch kursiv gestellte rote Buchstaben hervorgehoben.

Da die *Primer-Extension*-Methode sowohl Transkriptionsstartstellen als auch prozessierte 5'-Enden detektiert, wurde für die weitere Analyse eine modifizierte Form der (TAP)-Reverse-Ligation PCR (RLPCR) angewandt (Miyagi et al. 1998).

Hierzu wurde die Gesamt-RNA vor der *Primer-Extension*-Reaktion mit einem 103 bp langen RNA-Linker-Molekül ligiert. 5'-Enden plastidärer Transkripte unterscheiden sich durch die Zahl der Phosphoratome. Während Transkriptionsstartstellen drei endständige Phosphoratome in γ -, β - und α -Stellung besitzen, haben prozessierten 5'-Enden ein freies α -Phosphoratom. Ein synthetisiertes RNA-Molekül von definierter Länge (103 bp) ligiert nur mit dem freien α -Phosphoratom von prozessierten 5'-Enden und nicht mit echten Transkriptionsstartstellen. Die ligierte Gesamt-RNA wurde wie die nicht-ligierte RNA (=Kontrolle) in die *Primer-Extension*-Reaktion eingesetzt und nebeneinander einer Gelelektrophorese auf einem Sequenzgel aufgetrennt. Für die intermediären *Cuscuta*-Arten wurde beispielhaft *C. gronovii* verwendet, da sich *C. subinclusa* zu dieser Zeit nicht mehr im Bestand des Botanischen Gartens der Universität Kiel befand.

Das prozessierte 5'-Ende des *rbcL*-Genes von Tabak verlängert sich durch die Ligation mit dem RNA-Linker-Molekül um 103 bp auf eine Länge von 162 bp, wohingegen der Transkriptionsstart des Genes -180 bp vor dem ATG unverändert bleibt. Die *Primer-Extension*-Signale zeigen im Fall der beiden *Cuscuta*-Arten *C. reflexa* und *C. gronovii* wie die Transkriptionsstartstelle in Tabak keine Verschiebung (Abb. 38). Diese Ergebnisse beweisen, daß die durch die *Primer-Extension*-Analyse lokalisierten 5'-Enden von *C. reflexa* und *C. gronovii* ein intaktes Triphosphatende haben. Sowohl das starke *Primer-Extension*-Signal in *C. gronovii* bei -108 bp, als auch die oberhalb liegenden, schwächeren Signale stellen somit echte Transkriptionsstarts dar.

4 Ergebnisse

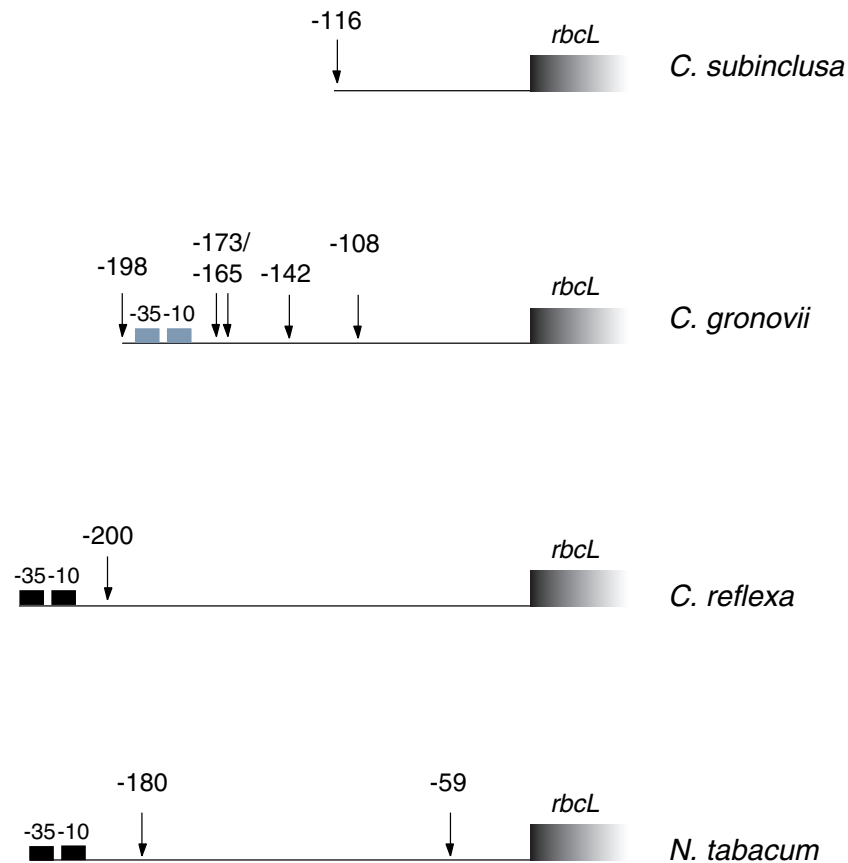


Abbildung 37 Schematischer Überblick über die *rbcL* Transkriptionsstarts. Dargestellt ist der Promotorbereich des *rbcL*-Genes von *N. tabacum*, *C. reflexa*, *C. gronovii* und *C. subinclusa*. Die schwarzen Pfeile deuten auf die durch *Primer-Extension-Analyse* identifizierten 5'-Enden in Relation zum kodierenden Bereich des *rbcL*-Genes. Konsensussequenzen des *rbcL*-PEP-Promotors („-35“, „-10“) bei *N. tabacum* und *C. reflexa* und die Konsensussequenzen des NEP-Promotors („GAA“ und „YRTA“) sind durch schwarze Boxen dargestellt. Die grauen Boxen zeigen die veränderte Sequenz des PEP-Promotors bei *C. gronovii*.

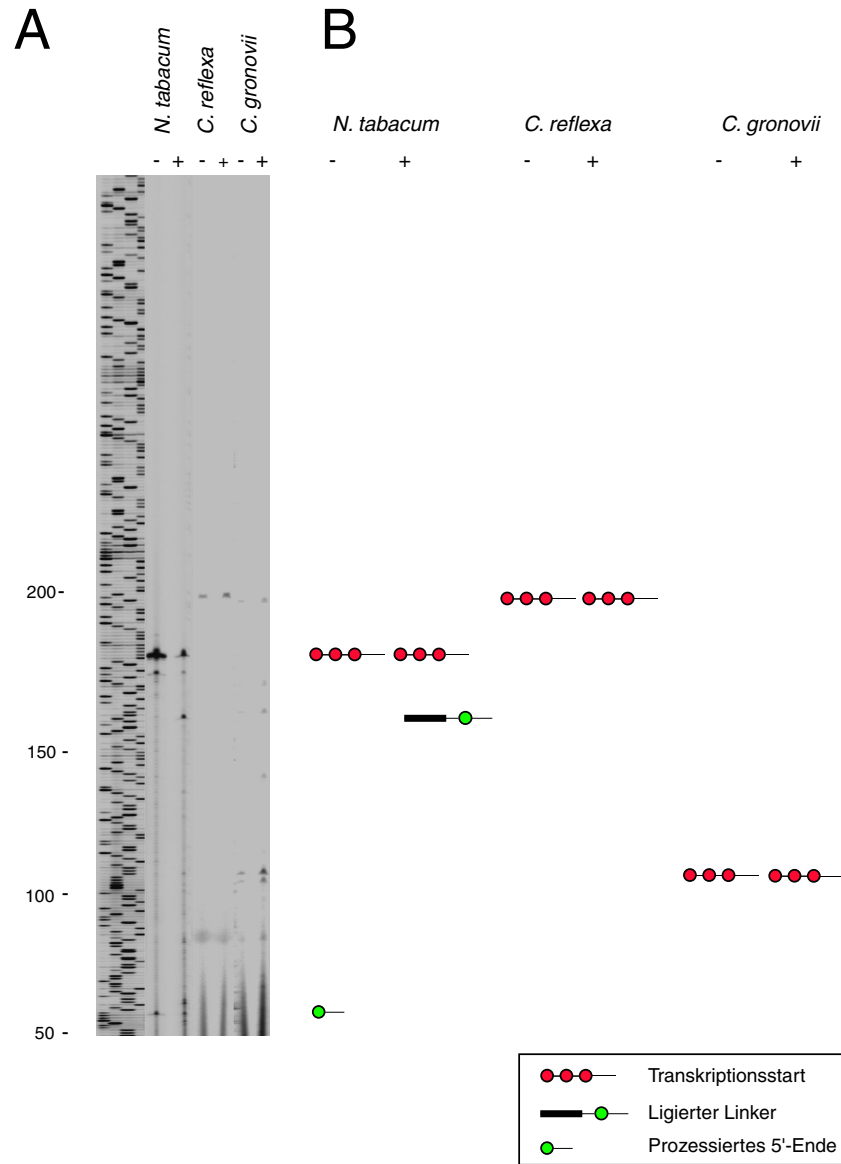


Abbildung 38 RNA-Ligationprozessierter 5'-Enden zur Unterscheidung von Transkriptionsstarts des *rbcL*-Genes. (A) Das RNA-Linkermolekül wurde an die 5'-Enden der Gesamt-RNA von *N. tabacum*, *C. reflexa* und *C. gronovii* ligiert, die danach in die *Primer-Extension*-Analyse eingesetzt wurde (s. 3.14.2). Für jede Art wurde die synthetisierte cDNA (+) neben einer cDNA ohne vorherige RNA-Ligation (-) aufgetragen. (B) Schematische Darstellung der 5'-Transkriptenden ohne (-) und mit (+) vorheriger RNA-Ligation.

4 Ergebnisse

Die Abbildung 39 zeigt die typische Konsensussequenz von NEP-Promotoren („YRTA“ mit zwischen 20–50 bp stromaufwärts liegender „GAA“-Box) verschiedener plastidärer Gene (Silhavy & Maliga 1998; Hübschmann & Börner 1998; Kapoor et al. 1997; Xie & Allison 2002). In allen untersuchten *Cuscuta*-Arten, in denen die ursprüngliche Transkription durch die PEP von der NEP ersetzt wurde, findet sich die typische „YRTA“-Erkennungssequenz zumeist in Kombination mit der stromaufwärts liegenden „GAA“-Box.

<i>C. subinclusa</i>	<i>rbcl</i>	agtcactgttatttataaacgtaaac GAA actaaaataccaaaat CATA aa	vorliegende Arbeit
<i>C. gronovii</i>	<i>rbcl</i>	at ttgttatttgtaaatacaactcaaaaacccaaa GAA taaaata TATA gg	"
<i>C. gronovii</i>	<i>rm16</i>	tcgttcgtgat GAA ctgttggtactagttatataatgtattttct TGTA ct	Krause et al., 2003
<i>C. subinclusa</i>	<i>rm16</i>	at GAA ttagattcgtattgg ttctgttggtactaggtattttct TGTA ct	Krause et al., 2003
<i>C. odorata</i>	<i>rm16</i>	at GAA ttagattcgtattgg ttctgttggtactaggtattttct TGTA ct	Krause et al., 2003
<i>Z. mays</i>	<i>atpB</i>	ttaagttaat GAA atgtttcatt CATA ta	Silhavy und Maliga, 1998
	<i>rpoB</i>	GAA atcgtctctattcattatgtatgaaata CATA ta	Silhavy und Maliga, 1998
	<i>clpP</i>	aatctatg tattaata GAA tctatagtattt TATA ga	Silhavy und Maliga, 1998
<i>H. vulgare</i>	<i>clpP</i>	ttccatcta tgtattaata GAA tctatagtatt CATA ta	Hübschmann und Börner, 1998
	<i>rpl23</i>	tcatccatacataac GAA ttggtatggatatt CATA cc	Hübschmann und Börner, 1998
<i>N. tabacum</i>	<i>atpB</i>	taGAAata GAA aataaagttcaggttcgaatt CATA ga	Kapoor et al., 1997, Xie und Allison, 2002

YRTA

Abbildung 39 Sequenzvergleiche ausgewählter NEP-Promotoren. Transkriptionsstarts, die unabhängig voneinander bestimmt wurden, sind durch fette Buchstaben hervorgehoben. „YRTA“ und „GAA“ sind Konsensussequenzen für die putative NEP-Erkennungssequenzen.

5 Diskussion

Die in dieser Arbeit untersuchten *Cuscuta*-Arten sind in unterschiedlichem Maße an die parasitische Lebensweise angepaßt. Die Auswirkungen des Parasitismus auf das Kodierungspotential des Plastidenchromosoms und auf den plastidären Genexpressionsapparat wurden untersucht. Ein Vergleich der einzelnen Anpassungsstufen, welche durch die verschiedenen Arten von *Cuscuta* repräsentiert werden, mit nicht-parasitisch lebenden Pflanzen ermöglicht neue Aussagen über die Funktion plastidärer Gene und des plastidären Genexpressionsapparates innerhalb dieser Gattung.

5.1 Größe und Kodierungspotential der Plastidenchromosomen der Gattung *Cuscuta*

Über die Struktur und den Gengehalt der Plastidenchromosome von Arten der Gattung *Cuscuta* lagen zu Beginn dieser Arbeit nur sehr wenige Informationen vor. Aufgrund des hohen Konservierungsgrades plastidärer Gene und des nahen Verwandtschaftsgrades zu der Solanaceae *N. tabacum* bieten sich vergleichende *Southern Blot*-Analysen mit dem Plastidenchromosom von Tabak mit markierter ptDNA aller drei untersuchten *Cuscuta*-Arten als Sonde an, um den Gengehalt abzuschätzen (s. 4.3.1).

Die in dieser Arbeit durchgeführten *Southern Blot*-Analysen mit dem kompletten Plastidenchromosom von Tabak dienten als Grundlage für die Erstellung von hypothetischen Plastomkarten (s. A.1.1). Die Größe des Plastidenchromosoms von *C. reflexa* wird, mit den zusätzlichen Informationen aus der Sequenzierung des Plastidenchromosoms, auf ca. 110 kb geschätzt, von *C. groenovii* auf ca. 80 kb und von *C. odorata* auf ca. 50 kb. Diese Reduktionsreihe im Kodierungspotential der Arten geht einher mit dem Verlust der Fähigkeit zur Photosynthese und den ultrastrukturellen Merkmalen der Plastiden (van der Kooji et al. 2000).

Das Ausmaß an Gendeletionen ist in den untersuchten *Cuscuta*-Arten unterschiedlich stark, und die Bedeutung soll im Folgenden für jede Art gesondert diskutiert werden.

5.1.1 Die grüne Art *C. reflexa*

Neben den Ergebnissen aus den *Southern Blot*-Analysen, in denen angereicherte pDNA der *Cuscuta*-Arten als Sonde diente, war die Analyse der DNA-Sequenz des plastidären Chromosoms von *C. reflexa* eine Voraussetzung zur Gewinnung von Erkenntnissen über die plastidäre Genexpression. Die Herstellung einer plastidären Klonbank und überlappender PCR-Fragmente dienten hierbei als Grundlage für die Erstellung einer annähernd vollständigen physikalischen Karte des Plastidenchromosoms (s. 4.1.1, 4.1.2).

Die vorliegenden Sequenzdaten ermöglichen folgende Schlüsse über Gehalt und Struktur des Plastidenchromosoms von *C. reflexa*: Das Plastidenchromosom ähnelt in seiner Struktur und der Anordnung seiner Gene den meisten der bisher beschriebenen Plastidenchromosomen (s. 1.2). Es scheint sich in zwei Bereiche, die einmalige Gene enthalten, zu gliedern, die von zwei Sequenzwiederholungen unterbrochen werden. Durch die Analyse der bisherigen Sequenzdaten und durch umfangreiche *Southern Blot*-Analysen wird die Länge des großen Bereiches mit einmalig vorkommenden Genen (*LSC*, *large single copy region*) auf 65 000 bp geschätzt, die Länge des kleinen Bereiches mit einmalig vorkommenden Genen (*SSC*, *small single copy region*) auf 10 000 bp und die der beiden gegenläufigen Sequenzwiederholungen (*IR inverted repeats*) auf 18 000 bp. Die Abbildung 40 gibt einen Überblick über die Anordnung der sequenzierten Gene in Form eines zirkulären Plastidenchromosoms. Da die Sequenz noch nicht vollständig ist, sind die Grenzen zwischen *LSC*-, *SSC*- und *IR*-Regionen nicht eingezeichnet. Die Anordnung der Gene auf dem vorläufigen Plastidenchromosom von *C. reflexa* erfolgte der Übersicht halber anhand der Genanordnung auf dem Plastidenchromosom von *N. tabacum*. Die Größe von unsequenzierten bzw. noch nicht untersuchten Bereichen ist hierbei nicht maßstabsgetreu eingezeichnet. Im Folgenden werden verschiedene funktionale Aspekte des Plastidenchromosoms näher erörtert.

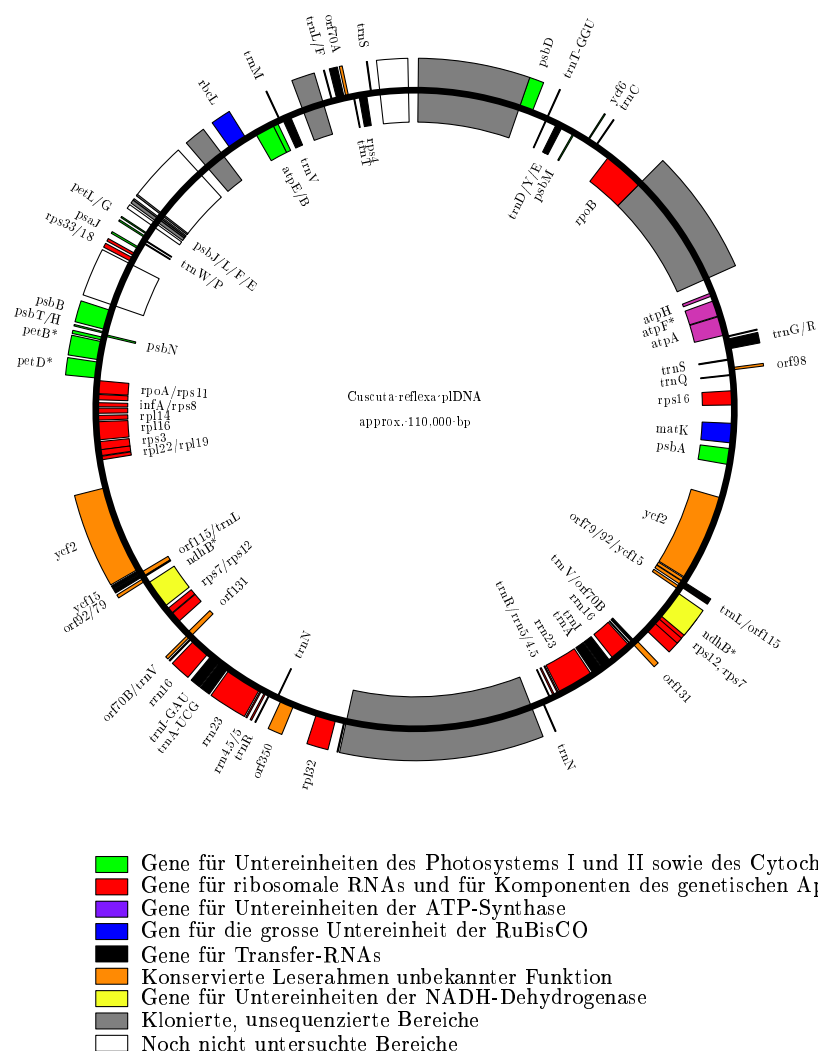


Abbildung 40 Hypothetische Struktur und Genorganisation des Plastidenchromosoms von *Cuscuta reflexa*. Gene mit Introns sind durch einen Stern markiert. In Bereichen, in denen die Sequenz-Daten nicht überlappten, wurde die Sequenz des Plastidenchromosoms von Tabak zugrunde gelegt. Gene im Innern des Kreises werden im Uhrzeigersinn transkribiert, Gene außerhalb des Kreises entgegen dem Uhrzeigersinn. Kästchenbereiche auf beiden Seiten des Stranges deuten an, daß der Strang, auf dem noch nicht untersuchte Genbereiche liegen, bisher unbekannt ist.

Replikationsursprünge

Die Replikation des Plastidenchromosoms wird in Höheren Pflanzen an Replikationsursprüngen (*origin of replikation, ori*) initiiert. Eine Konservierung dieser Sequenzen ist somit die Voraussetzung dafür, daß das Chromosom vervielfältigt werden kann.

OriA liegt auch in *C. reflexa* innerhalb des Introns des *trnI*-Gens und ist bis auf eine Basendeletion stark konserviert (s. 4.2.2). *OriB*, der zweite Replikationsursprung, wurde innerhalb der gegenläufigen Enden in der IR-Region im *ycf1*-Gen bzw. *orf350* gefunden und besteht ebenfalls aus einer großen Schleifensekundärstruktur und diversen direkten Sequenzwiederholungen. Durch die Deletion des *orf350*-Gens ist der *oriB* innerhalb dieses Gens nicht mehr vorhanden. Versuche an *in vitro*-deletierten Tabakpflanzen konnten zeigen, daß die Sequenz des *oriB* innerhalb des *orf350*-Gens deletiert werden kann, nicht jedoch innerhalb des *ycf1*-Gens (Muhlbauer et al. 2002). Es ist zu vermuten, daß die *In vitro*-Deletion des *oriB* das für den Plastiden essentielle Gen *ycf1* beeinflußt, weshalb keine Deletion möglich ist. Eine vollständige Sequenzierung des *ycf1*-Gens wird zeigen, ob der Replikationsursprung in diesem Gen vorhanden ist. Ein drittes Sequenzelement innerhalb des *ndhF*-Gens, welches Plasmide in Hefe zu autonom replizierenden Elementen macht (*ars1*) (Ohtani et al. 1984) ist in Tabak beschrieben worden, eine Funktion in der plastidären Replikation ist jedoch nicht nachgewiesen. Durch die Deletion des *ndhF*-Genes fehlt dieses Element und scheint daher für die Replikation des Plastidenchromosoms in *C. reflexa* bedeutungslos zu sein.

OriA und höchstwahrscheinlich auch *oriB*, welcher innerhalb eines für die Plastiden essentiellen Gens liegt, sind hochkonserviert in *C. reflexa*. Dies läßt darauf schließen, daß die Replikation des Plastidenchromosoms von *C. reflexa* zumindest von einem funktionstüchtigen Replikationsursprung aus durchgeführt wird und eine Vervielfältigung des Chromosoms möglich ist.

Analyse von proteinkodierenden Genen

Unter den 31 identifizierten proteinkodierenden Genen in der Sequenz von *C. reflexa* befinden sich Gene, die für Komponenten des Photosyntheseapparates kodieren, für die Untereinheiten der ATPase, für Komponenten des Genexpressionssystems und für die Maturase *matK* (s. 4.2.1).

Als besonders konservierte Gene im Vergleich zum Tabakplastidenchromosom erwiesen sich die Gene der Photosynthesekomplexe, wie *psbA*, *psbB*, *psbC* und *psbD*. *C. reflexa* besitzt alle essentiellen Photosynthesegene (eigene Untersu-

chungen und Haberhausen et al. (1992)). Diese zeigen hohe Sequenzhomologie (z.B. *psaA*, *psbA*, *psbC* und *psbD*) im Vergleich mit den entsprechenden Genen von *N. tabacum* (über 90%). Starke Veränderungen dieser Gene in der Sequenz bzw. ein Verlust eines oder mehrerer dieser Gene würde auch einen Verlust der Photosynthese nach sich ziehen, was eine Erklärung für die starke Konservierung sein könnte.

Die Sequenzveränderung kleinerer Photosynthesegene könnte dagegen eine der Ursachen dafür sein, daß *C. reflexa* eine verminderte Photosyntheseleistung aufweist (van der Kooji et al. 2000). Ein Beispiel hierfür liefert das *psaJ*-Gen. Das zugehörige Protein PSI-J stabilisiert in *Synechocystis* das Protein PSI-F und stellt somit sicher, daß ein effizienter Transfer von Elektronen vom Plastocyanin zum Photosystem I stattfindet (Scheller et al. 2001). Mutationen in diesen strukturgebenden, peripheren Photosynthesegenen könnten einen verminderten Elektronentransfer bewirken und somit die Leistung des Photosystems erniedrigen.

Auch die Proteine der ATPase zeigen eine hohe Rate von Aminosäureaustauschen, was darauf hindeuten könnte, daß dieser Proteinkomplex in *C. reflexa* an Bedeutung verliert und die Gene nicht mehr unter so einem hohen Selektionsdruck stehen. Im Gegensatz dazu weist das 54 100 bp große Plastidenchromosom der heterotroph lebenden Alge *Prototheca wickerhamii* eine Vielzahl von Gendelektionen besonders im Bereich der Photosynthesegene auf. Die Untereinheiten der zum Teil plastidär kodierten ATPase sind jedoch in dieser Art stark konserviert und entsprechende Transkripte der Gene können detektiert werden. Ein funktioneller Nachweis der ATPase muß noch erbracht werden, könnte aber auf eine neue Rolle der plastidären ATP-Synthase in heterotroph lebenden, einzelligen Algen hinweisen (Knauf & Hachtel 2002).

Der weniger starke Selektionsdruck zur Erhaltung der *atp*-Gene in *C. reflexa* läßt sich möglicherweise durch die parasitische Lebensweise der Pflanze erklären. Da die Pflanze Nährstoffe durch den Wirt erhält, spielt die eigene Produktion von ATP in den Chloroplasten eine untergeordnete Rolle und ist vielleicht nur für bestimmte Phasen des Lebenszyklus wichtig, während der Keimung oder in einer Streßsituation, in der sich der Parasit eine neue Wirtspflanze suchen muß.

Unter den Komponenten des Genexpressionsapparates befinden sich sowohl sehr stark konservierte Proteine (z.B. *rps7*) als auch weniger stark konservierte Proteine (z.B. *rps4*, *rpl33*, *rpoA* und *rpoB*). Mit über 32% an Aminosäuresubstitutionen im Vergleich zum entsprechenden Protein von *N. tabacum* ist die Maturase K das am wenigsten konservierte Protein. Die Maturase, von der angenommen wird, daß sie wichtig für das Spleissen der *trnK* ist, hat durch den Verlust dieser tRNA eventuell ihre Funktion verloren und steht deshalb nicht mehr unter starkem Selektionsdruck.

Analyse von offenen Leserahmen unbekannter Funktion

In *N. tabacum* sind 11 offene Leserahmen annotiert worden, deren Genprodukte (noch) keine Funktion zugeschrieben bekommen haben. Ein Vergleich mit vorhandenen offenen Leserahmen in *Cuscuta reflexa* könnte Aufschluß über die Notwendigkeit des Gens in Höheren Pflanzen allgemein liefern. Ist ein offener Leserahmen nicht mehr auf dem Plastidenchromosom von *C.reflexa* vorhanden, so ist anzunehmen, daß das Gen keine essentielle Funktion für die Plastide hat.

Eine dritte Gruppe wichtiger funktioneller Gene sind neben den echten Genen und ORFs die hypothetischen offenen Leserahmen (*ycf*). Die Funktion dieser Leserahmen ist zwar unbekannt, eine hohe Sequenzkonservierung unter phylogenetisch sehr verschiedenen Pflanzen deutet jedoch darauf hin, daß sie für die Pflanze essentiell sind. Eine Sonderrolle nehmen hierbei die drei Leserahmen *ycf1*, *ycf2* und *ycf15* ein, für die es keine prokaryotischen Äquivalente gibt (Martin & Herrmann 1998). *ycf1* und *ycf2* sind für die Pflanzen essentielle Gene (Drescher et al. 2000), für *ycf15* besteht ein solcher Nachweis noch nicht. In *Cuscuta reflexa* ist der Leserahmen von *ycf2* von 2281 Aminosäuren in *N. tabacum* durch Deletion auf 740 Aminosäuren reduziert (Bömmer et al. 1993). Obwohl *ycf2* in bisher allen vollständig sequenzierten Plastidenchromosomen vorhanden (Stoebe et al. 1998) und in seiner Sequenz stark variabel ist, bleibt es fraglich, ob der stark reduzierte Leserahmen des Genes in *C.reflexa* ein funktionelles Protein kodiert.

Deletionen von Genen

Vorangehende Sequenzuntersuchungen an der grünen, photosynthetisch aktiven Art *C. reflexa* zeigten, daß sich unter den deletierten plastidären Genen die Untereinheiten des *NADH*-Komplexes, tRNAs und zwei ribosomale Proteine befinden (Haberhausen et al. 1992; Bömmer et al. 1993; Haberhausen & Zetsche 1994). Diese Befunde konnten in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden (s. 4.2.2).

Das Fehlen dieser Gene wirft die Frage nach der Funktion des *NADH*-Komplexes in den Plastiden auf. Die Untereinheiten des *NADH*-Komplexes fehlen auch in den Plastiden anderer Pflanzenarten, sowohl in photosynthetisch aktiven, wie in der Alge *Euglena gracilis* (Hallick et al. 1993), der Gymnosperme *Pinus thunbergii* (Wakasugi et al. 1994) und der Rotalge *Porphyra purpurea* (Reith & Munholland 1993), als auch photosynthetisch inaktiven, z.B. in dem Holoparasiten *Epifagus virginiana* (Wolfe et al. 1992a). Burrows et al. (1998) diskutieren eine Rolle des *NADH*-Komplexes im zyklischen Elektronentransport im

Licht und vermutlich eine Beteiligung an der Chlororespiration im Dunkeln. Der zyklische Elektronentransport trägt zusätzlich zum Aufbau des Protonengradienten bei und ist somit an der Synthese von zusätzlichem ATP, z.B. in einer Streßsituation für die Pflanze, beteiligt. Da die Arten der Gattung *Cuscuta* ihre Nährstoffe von der Wirtspflanze erhalten, sind sie nicht auf die Synthese von zusätzlichen, selbst synthetisierten Reduktionsäquivalenten, z.B. durch den zyklischen Elektronentransport, angewiesen. Die prinzipielle Möglichkeit, daß die *ndh*-Gene ins Kerngenom transferiert wurden, ist daher als unwahrscheinlich anzusehen.

Interessant ist auch der Verlust von drei tRNAs, *trnK-UUU*, *trnI-CAU* und *trnV-UAC*, in *C. reflexa* (s. 4.2.2). Auf dem Plastidenchromosom von *E. virginiana* fehlen 13 von 30 tRNAs (Wolfe et al. 1992a; Wolfe et al. 1992b; Lohan & Wolfe 1998). Da Genexpression in den Plastiden von *E. virginiana* funktional ist, müssen cytoplasmatische tRNAs die Rolle der fehlenden plastidären tRNAs übernehmen und in die Plastiden importiert werden. Daher wurde ein Importsystem von tRNAs in Plastiden angenommen. Ein Importsystem für tRNAs wurde bisher nur für den Import von cytoplasmatischen tRNAs in die Mitochondrien beschrieben. Möglich wäre ein tRNA-Coimport mit RNaseP, der 4.5S RNA-Komponente der Signal Recognition Particles (Lohan & Wolfe 1998). Eine weitere Möglichkeit, den Verlust der tRNAs auszugleichen, stellt das *enhanced wobble* dar (Morden et al. 1991), d.h. daß tRNAs, die in ihrer dritten Kodonposition ein anderes Basenpaar haben, die Funktion der verlorenen tRNAs übernehmen und so den Verlust ausgleichen können.

Der Transfer von ehemals plastidär kodierten Genen in den Kern bedeutet für die Plastiden zwar ein erhöhtes Abhängigkeitsverhältnis, hat aber auch Vorteile in Bezug auf die größere Rekombinationsmöglichkeit innerhalb des Kerns. Plastiden waren ehemals freilebende Bakterien mit der Möglichkeit zur Rekombination. Durch die Endosymbiose ist diese Möglichkeit unterbunden worden und somit auch die Möglichkeit, die Anhäufung von Mutationen, die eventuell im Laufe der Zeit entstehen, durch Rekombination zu entfernen (Muller 1964). Da die Möglichkeit zur Rekombination in der Plastide zwar durch DNA-Austausch zwischen den Plastiden gegeben (Fischer et al. 1996) und auch ein RecA-homologes kernkodiertes Protein in den Plastiden aktiv ist (Cerutti et al. 1995), wird angenommen, daß dieser Transfer nur sehr langsam abläuft. Dieser Transfer von plastidären Genen in den Kern ermöglicht somit eine erhöhte Rekombinationsmöglichkeit (Martin & Herrmann 1998).

Deletionen in intergenischen Bereichen

Die *psbD*- und *psbC*-Gene kodieren für die D2- und CP43-Untereinheiten des Photosystems II in Höheren Pflanzen (Vermaas & Ikeuchi 1991). Beide Gene liegen auf einem Operon, das von drei verschiedenen Promotoren aus transkribiert wird (Sexton et al. 1990). Von den Promotoren, die –190, –550 und –950 bp vor dem Transkriptionsstart liegen, unterliegt der des längsten Transkriptes einer licht- und entwicklungsabhängigen Induktion. In reifen Chloroplasten geht die Transkription von einem PEP-Promotor aus, der durch einen blaulicht-induzierten Faktor aktiviert wird (*blue-light-responsive promoter* (BLRP)) (Christopher & Mullet 1994; Christopher 1996; Hoffer & Christopher 1997). Diese mRNA hat den größten Anteil an der *psbD* mRNA und ist wichtig für die *De-novo*-Synthese des D2-Proteins, welches im Licht eine hohe Umsatzrate hat (Mullet et al. 1990; Christopher & Mullet 1994).

Der Promotor und das *psbD/psbC*-Operon sind in allen bisher sequenzierten Plastidenchromosomen außer bei *Epifagus virginiana* (Wolfe et al. 1992a) und bei *Marchantia polymorpha* (Shimada & Sugiura 1991) als eine Einheit gefunden worden. Auch in *C. reflexa* konnte eine hohe Sequenzhomologie zu den bereits beschriebenen Promotoren von *N. tabacum*, *H. vulgare* und *A. thaliana* im Bereich des Promotors nachgewiesen werden (Abb. 18, 19). Die starke Konservierung dieses Promotors deutet darauf hin, daß die Transkription des *psbD/psbC*-Operons in *C. reflexa* zu einem bestimmten Zeitpunkt der Entwicklung der Pflanze über diesen Mechanismus reguliert wird. Eine weitere konservierte PEP-Promotorsequenz stromabwärts des durch Blaulicht induzierten Promotors läßt auf eine mögliche differenzielle Regulation dieses Operons schließen. Um genauere Aussagen über die Bedeutung der Promotoren des Operons machen zu können, ist eine Analyse der 5'-Enden des Transkriptes unter variablen Lichtbedingungen, z.B. durch *Primer-Extensions*, nötig.

Translationsrelevante Sequenzelemente

Die Funktionalität von Shine-Dalgarno (SD)-Sequenzen ist nur für wenige plastidäre Gene in Tabak untersucht worden. Unter Anwendung eines plastidären *In vitro*-Systems konnte für die SD-Sequenzen von *rps14*, *atpE* und *rbcL* gezeigt werden, daß diese unerlässlich für die Initiation der Translation sind (Sugiura et al. 1998). Es spielen aber bei der Translationsregulation auch weitere Sequenzelemente eine Rolle. So sind z.B. die zwei Sequenzen RBS 1 und RBS 2 und die AU-reiche Box vor dem *psbA*-Gen notwendig für die Translation (Hirose & Sugiura 1996). Diese sind im 5'UTR des *psbA*-Genes stark konserviert (Bömmer

et al. 1993). Zusätzlich konnte gezeigt werden, daß Licht eine wichtige Rolle sowohl für die Akkumulation der mRNA als auch bei der Translation dieses Gens spielt (Staub & Maliga 1993; Hirose & Sugiura 1996; Eibl et al. 1999). Transkriptstabilisierende Elemente in der 5'UTR der *rbcL* mRNA sind in *C.reflexa* mit einigen Sequenzveränderungen vorhanden, was darauf hindeutet, daß die Stabilisierung dieser mRNA in *C.reflexa* von Bedeutung ist (Abb. 35).

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Veränderungen im Gengehalt und der Struktur des Plastidenchromosoms, die anhand der bisherigen Sequenzanalyse des Plastidenchromosoms ermittelt wurde, in *C. reflexa* als geringfügig einzustufen sind. Dieses könnte darauf hinweisen, daß es sich bei *C.reflexa* um ein junges Stadium der Anpassung an die parasitische Lebensweise handelt, welches in seiner Entwicklungsstufe zwischen nicht-parasitisch lebenden Pflanzen und den intermediären *Cuscuta*-Arten steht. Die Auswirkungen der parasitischen Lebensweise sind zwar auf der morphologischen Ebene sehr drastisch, wie die Entwicklung von Haustorien oder der Verlust der Blätter verdeutlicht. Auf der Ebene des Plastidenchromosoms zeigen sich jedoch nur geringe Veränderungen, was in Einklang mit der Konserviertheit des Plastidenchromosoms steht (Palmer 1990).

Die starke Konservierung von Photosynthesegenen oder der Erhalt einer Vielzahl von regulativen Elementen auf dem Plastidenchromosom, die auch in der nicht-parasitisch lebenden Pflanze *N. tabacum* vorhanden sind, verdeutlichen die wesentlich langsameren Auswirkungen der parasitischen Lebensweise auf die Struktur und das Kodierungspotential des Plastidenchromosoms. Das Vorhandensein einiger Pseudogene, z.B. *ndhB*, *rps16* und die starke Sequenzveränderung einiger proteinkodierender Gene, z.B. von *matK*, deutet jedoch an, daß die parasitische Lebensweise auch einige Auswirkungen auf das Plastidenchromosom hat. In nicht-parasitischen Pflanzen werden funktionslose Gene zumeist sofort deletiert (Palmer 1990). Dieser Selektionsdruck für den Erhalt der Photosynthesegene entfällt in parasitischen Pflanzen, und so ist in den chlorophylllosen Arten *E. virginiana* und *L. clandestina* eine Vielzahl von funktionslosen Pseudogenen zu finden (Wolfe et al. 1992b; Lohan & Wolfe 1998).

Der Verlust von Genen im Plastidenchromosom oder der Transfer von Genen in den Kern der grünen Art *C. reflexa* ist noch nicht abgeschlossen, wie z.B. in holoparasitisch lebenden Arten *E. virginiana* und *L. clandestina*. Deshalb eignet sich diese Art sehr gut als Untersuchungsobjekt dafür, welche Gene als erste unter einem schwächer werdenden Selektionsdruck verloren gehen.

5.1.2 Die intermediäre Art *C. gronovii*

In der intermediären Art *C. gronovii* zeigt die vergleichende *Southern Blot*-Analyse, in der die pDNA dieser Art als Sonde eingesetzt wurde, Hybridisierungssignale für verschiedene Photosynthesegene, z.B. für die Gene *psaA*, *psaB*, *psbC*, *psbD*, für die Untereinheiten der plastidären ATPase, für verschiedene ribosomale Proteine und für tRNAs (Abb. 24). Es fehlen allerdings die Untereinheiten der plastidär kodierten RNA-Polymerase auf dem Plastidenchromosom von *C. gronovii*, die auf dem Plastidenchromosom von *C. reflexa* vorhanden sind (Krause et al. 2003). Mit dem Verlust der *rpo*-Gene ist es zu einer sehr einschneidenden Veränderung für die plastidäre Genexpression in der Gattung *Cuscuta* gekommen. Die Deletion von *rpo*-Untereinheiten beispielsweise in Tabakpflanzen (Allison et al. 1996; De Santis-Maciossek et al. 1999) führt zu einem Verlust der Photosynthesefähigkeit, diese Pflanzen können nicht ergrünen. Die natürliche Deletion der plastidär kodierten RNA-Polymerase hat entscheidende Auswirkungen auf die plastidäre Transkription und letztendlich auf die Funktion des Plastiden. Die Transkription der Gene durch eine nukleär kodierte Polymerase ist auch in nichtparasitisch lebenden Pflanzen ein wichtiger Schritt in der Kontrolle des Kerns über das Organell und bedeutet eine weitere Maßnahme, um den ehemals freilebenden Endosymbionten unter die Kontrolle des Kerns zu stellen (Liere & Maliga 1999). In den intermediären und weißen Arten der Gattung *Cuscuta* ist dieser Kontrollgewinn noch einen Schritt weiter entwickelt, indem die plastidäre Transkription nur noch durch das kernkodierte Enzym durchgeführt wird.

Natürliche Mutationen der *rpo*-Untereinheiten sind zwar auch in anderen parasitisch lebenden Pflanzen oder heterotroph lebenden Algen bekannt (Morden et al. 1991; Wimpee et al. 1991; Delavault & Thalouarn 1994). In diesen Fällen ist der Genverlust im gesamten Plastidenchromosom schon so weit vorangeschritten, daß die Deletion der *rpo*-Untereinheiten mit der Deletion von Photosynthesegenen einhergeht. Die intermediären *Cuscuta*-Arten sind somit ein einmaliges Entwicklungsstadium in der Evolution der Gattung *Cuscuta*, in denen die Untereinheiten der PEP verloren gegangen sind, funktionelle Photosynthesegene jedoch erhalten sind. Daher läßt sich auch eine zeitliche Abfolge der Gendeletionen in Bezug auf die reduzierten Plastiden von *C. odorata* vermuten, nämlich zunächst der Verlust der *rpo*-Gene bei wahrscheinlich noch funktioneller Photosynthese. Erst dann kam es wahrscheinlich durch den Verlust der entsprechenden Gene zum Verlust der Photosynthesefähigkeit. Ob diese Reihenfolge an Deletionen zu verallgemeinern ist, läßt sich anhand dieses Beispiels jedoch nicht aussagen.

Die Deletion von *rpo*-Untereinheiten und Photosynthesegenen ist auch in anderen parasitischen Pflanzenarten zu finden, und die parasitisch lebende Pflanze *L. clandestina* ist ein Beispiel für eine möglicherweise andere Reihenfolge des Verlustes von plastidärer RNA-Polymerase und Photosynthesefähigkeit. Auch diese Pflanze steht in ihrer Entwicklung zwischen *Epifagus virgiana*, ohne PEP, und *C. reflexa*, mit PEP (Delavault et al. 1996). In dieser Pflanze lassen sich die *rpo*-Untereinheiten der PEP zwar nachweisen, diese stellen jedoch durch eine Vielzahl von Stoppkodonen in der Sequenz Pseudogene dar (Lusson et al. 1998). Viele Photosynthesegene sind jedoch nicht mehr auf dem Plastidenchromosom vorhanden. Da die *rpo*-Gene dieser Pflanze als Pseudogene vorliegen, stellen diese Deletionen möglicherweise ein jüngeres Ereignis dar als die Deletion der Photosynthesegene. In diesem Fall könnte somit der vorangegangene Verlust der Photosynthesefähigkeit PEP und somit den Erhalt der *rpo*-Untereinheiten überflüssig gemacht haben. Auffällig im Vergleich zum Holoparasiten *L. clandestina* ist außerdem, daß es für die grüne Art *C. reflexa* und intermediäre *Cuscuta*-Arten wie *C. gronovii* anscheinend einen Selektionsvorteil bedeutet, die Photosynthesefähigkeit zu erhalten. Der Grund hierfür ist unter Umständen nicht in einer zusätzlichen Energiegewinnung zu finden, denn die Nettophotosyntheserate übersteigt nicht den Kompensationspunkt (van der Kooji et al. 2000). Möglicherweise bietet die an die Lichtreaktion gekoppelte Redoxkontrolle von plastidären Enzymen über das Ferredoxin-Thioredoxin-System einen entscheidenden Selektionsvorteil, der den Erhalt eines reduziert funktionsfähigen Photosystems rechtfertigt (Jacquot et al. 2002; Allen 2003).

Die intermediären *Cuscuta*-Pflanzen sind in evolutionärer Hinsicht ein interessantes Zwischenstadium unter den untersuchten *Cuscuta*-Arten. Mit dem Verlust der *rpo*-Gene, aber dem Erhalt der Fähigkeit, zu ergrünen und Photosynthese betreiben zu können, stehen diese Arten zwischen der grünen Art *C. reflexa* und der weißen Art *C. odorata*. Weitere Entwicklungsstadien der Gattung *Cuscuta*, welche zwischen *C. reflexa* und den intermediären Arten mit Deletionen in den *rpo*-Untereinheiten stehen, könnten z.B. wichtige Hinweise zur zeitlichen Abfolge des Verlustes der plastidären RNA-Polymerase geben. Denkbar wäre es, daß eine der Untereinheiten, z.B. *rpoA*, zunächst in den Zellkern verlagert wird. Solch ein Entwicklungsstadium, in dem die Pflanze noch eine funktionelle PEP besitzt, eine Untereinheit der RNA-Polymerase jedoch auf dem Plastidenchromosom fehlt, ist in der Alge *Euglena gracilis* zu finden (Hallick et al. 1993). Hier fehlt die *rpoA*-Untereinheit der PEP auf dem Plastidenchromosom, PEP-Promotorstrukturen sind jedoch konserviert (Doetsch et al. 2001). Es ist anzunehmen, daß die fehlende Untereinheit im Kern lokalisiert ist und post-translational in die Plastiden importiert wird.

5.1.3 Die weiße Art *C. odorata*

Das Plastidenchromosom in der weißen Art *C. odorata* stellt das am stärksten reduzierte Chromosom der untersuchten *Cuscuta*-Arten dar. Die vergleichende *Southern Blot*-Analyse, in der pDNA dieser Art als Sonde eingesetzt wurde, zeigt fast ausschließliche Hybridisierungssignale von Genen, die am plastidären Translationsapparat beteiligt sind, u.a. *rrn5*, *rrn4.5*, *rrn16*, *rrn23* (Abb. 24, 25). Krause et al. (2003) zeigte zudem, daß das *rrn16*-Gen in *C. odorata* vorhanden ist und exprimiert wird. Damit ähnelt das Plastidenchromosom von *C. odorata* den Reduktionen in Plastidenchromosomen bereits bekannter parasitisch lebender Pflanzen wie *Epifagus virginiana*, *Conopholis americana* oder *Orobanche hederæ*. Auch in diesen Parasitenarten sind durch den Wegfall des Selektionsdrucks Photosynthesegene verloren gegangen oder in Pseudogene umgewandelt worden (Morden et al. 1991; Wimpee et al. 1991; Delavault & Thalouarn 1994). Thalouarn et al. (1994) schlagen vier gemeinsame Charakteristika dieser parasitisch lebenden Pflanzen vor, die auch für das Plastidenchromosom von *C. odorata* zutreffen könnten: (a) das Plastidenchromosom dieser Arten ist nur noch halb so groß wie das Chromosom nicht-parasitisch lebender Arten, z.B. *N. tabacum*, (b) die meisten Gendeletionen haben im Bereich des LSC und SSC stattgefunden, wohingegen der IR dem von *N. tabacum* vergleichbar ist, (c) die meisten bzw. alle Photosynthesegene sind verloren und (d) ribosomale RNA, ribosomale Proteine und tRNAs sind vorhanden, was darauf hindeutet, daß die Genexpression in den Plastiden funktionell ist. Die vergleichenden *Southern blot*-Analysen des Plastidenchromosoms von *C. odorata* mit *N. tabacum* deuten darauf hin, daß die vier Charakteristika auch auf das Chromosom dieser Art zutreffen könnten.

Da die Photosynthese in diesen extrem reduzierten Plastiden keine Bedeutung mehr hat, stellt sich die Frage nach der Bedeutung des Erhaltes des Organells mit einem funktionstüchtigen Genom. Der Verlust der Photosynthesefähigkeit hat auch in einer Vielzahl von durch sekundäre Endosymbiose entstandenen Plastiden wie in *Astasia longa* (Gockel & Hachtel 2000) oder in verschiedenen Arten der Dinoflagellaten stattgefunden. Auch hier wird die Funktion der Plastiden in der Biosynthese und Speicherung von Stärke oder der Biosynthese von Fettsäuren vermutet (Siemeister & Hachtel 1989; DePamphilis & Palmer 1990). Die Reduktionsreihe des Plastiden in den Dinoflagellaten ist so weitreichend, daß es bis zu einem vollständigen Verlust des kompletten Organells kommen kann (Saldarriaga et al. 2001). Die Plastiden der Dinoflagellaten sind jedoch durch sekundäre Endosymbiose entstanden und stellen damit einen Sonderfall der Plastidenentwicklung dar (McFadden 2001). Das Gleiche

gilt auch für den wahrscheinlich durch sekundäre Endosymbiose erworbenen Plastiden der Trypanosomen, auf dessen ehemalige Existenz nur noch in den Kern transferierte Plastidengene hinweisen (Martin & Borst 2003). Der Verlust von Plastiden Höherer Pflanzen ist noch nicht beschrieben worden, was ein weiteres Indiz dafür sein könnte, daß für die Zelle essentielle Funktionen in diesem Organell ablaufen müssen.

Eine parallele Entwicklung des Genverlustes in einem Organellenchromosom ist in den Mitochondrien zu finden. Im Verlauf der Evolution ist auch in diesem Organell eine Vielzahl von Genen in den Kern transloziert worden. Einige Autoren diskutieren, daß die Hydrogenosomen, ATP-produzierende Organelle von mitochondrienlosen Protisten, als ein Endstadium dieser Entwicklung angesehen werden können, da kein Genom mehr in diesen Organellen vorhanden ist (Embley et al. 2003). Anhand dieses Entwicklungsstadiums, in dem der endosymbiotische Gentransfer vollendet wurde, läßt sich vermuten, daß es Gene des Translationsapparats, und im Fall der Mitochondrien, des Respirationsapparats sind, die als letzte in den Kern transferiert werden.

Der Erhalt eines funktionalen Translationsapparates scheint auch für die Plastiden der weißen Art *C. odorata* von Bedeutung zu sein, weshalb der Grund für den Erhalt des Plastidenchromosoms in den noch verbleibenden Genen zu suchen ist, die nicht für den plastidären Genexpressionsapparat kodieren. Einige plastidäre Gene sind in der Sequenz von allen bis heute sequenzierten Plastidenchromosomen zu finden (Stoebe et al. 1998). Unter diesen befinden sich die Gene *ycf1* und *ycf2*, deren Funktionen bisher allerdings noch nicht bekannt sind, aber den Erhalt der Plastide rechtfertigen könnten (Drescher et al. 2000). Das *accD*-Gen, welches für das plastidäre Homolog der β -Untereinheit der Carboxyltransferase-Komponente der Acetyl-CoA-Carboxylase aus *E. coli* kodiert und den ersten Schritt in der Fettsäurebiosynthese katalysiert, ist in allen bisher sequenzierten Plastidenchromosomen dikotyler Pflanzen, nicht aber unter den monokotylen Pflanzen erhalten worden (Maier et al. 1995; Ogihara et al. 2002). Auch in den extrem angepaßten Plastiden der Apikomplexa, wie in dem Malariaerreger *Plasmodium falciparum*, ist wahrscheinlich die Synthese von Fettsäuren der Hauptgrund, der den Erhalt des Kompartimentes in dem Parasiten rechtfertigt und den Import hunderter nukleär kodierter Proteine nötig macht (Waller et al. 1998; Wilson et al. 2003). Das *accD*-Gen ist in den drei untersuchten *Cuscuta*-Arten durch *Southern Blot*-Analyse nachgewiesen (Abb. 29), deshalb könnte dieses Gen und die damit zusammenhängende Synthese von Fettsäuren in den Plastiden einer der Gründe sein, der den Erhalt des Kompartiments nötig macht.

Das *clpP*-Gen, welches das plastidäre Homolog der proteolytischen Unter-

einheit der ATP-abhängigen Clp Protease aus *E.coli* kodiert, und die Maturase *matK*, die wahrscheinlich in plastidären Splicingprozessen eine Rolle spielt, sind weitere interessante Genprodukte, die essentiell für die Plastide und Zelle sein könnten. Eine *Southern Blot*-Analyse mit einer genspezifischen Sonde für das *clpP*-Gen zeigte jedoch, daß dieses Gen anscheinend nicht mehr auf den Plastidenchromosomen der untersuchten *Cuscuta*-Arten vorhanden ist (Abb. 29). Da für die Hybridisierung jedoch keine artspezifische Sonde verwendet wurde, sondern ein Plastomfragment aus *Hordeum vulgare*, ist es möglich, daß das *clpP*-Gen, welches in *N. tabacum* aus zwei Intron- und drei Exonbereichen besteht, nicht erfaßt wurde. In der Hybridisierung mit isolierter pDNA der untersuchten *Cuscuta*-Arten als Sonde hybridisiert dieses Gen (Abb. 24, 25). Eine Wiederholung der Hybridisierung mit einer artspezifischen Sonde ist hier wichtig, um festzustellen, ob das Gen wirklich auf den Plastidenchromosomen fehlt, da es eines der für die Plastide essentiellen Gene zu sein scheint.

Mit den stark reduzierten Plastiden und der Vielzahl von Deletionen auf dem Plastidenchromosom ähnelt *C. odorata* bekannten parasitisch lebenden Pflanzen. Die Bestimmung der Sequenz des Plastidenchromosoms von *C. odorata* und der Nachweis der Bioproteinsynthese, z.B. durch den Nachweis von funktionellen Ribosomen, kann zum einen trotzdem wichtige Hinweise über die Funktion der Plastiden in dieser Art liefern. Zum anderen besteht durch den Vergleich mit anderen rezenten Entwicklungsstadien aus der gleichen Gattung die einmalige Möglichkeit, Aussagen über den evolutionären Mechanismus von Gendeletionen in parasitisch lebenden Pflanzen zu machen.

Die Abbildung 41 faßt die Ergebnisse der vergleichenden Analysen zum Kodierungspotential der untersuchten *Cuscuta*-Arten zusammen und verdeutlicht das Ausmaß und die evolutionäre Reihenfolge der Gendeletionen innerhalb dieser Gattung. Aus den bisherigen Ergebnissen läßt sich jedoch keine Allgemeingültigkeit für den Verlust von Genen in Anpassung an die parasitische Lebensweise ableiten, da Genverluste in anderen parasitisch lebenden Pflanzengattungen auch in einer anderen Reihenfolge abgelaufen sein könnten. Die Besonderheit der Gattung *Cuscuta* besteht darin, daß sie sowohl chlorophyllhaltige, photosynthetisch aktive Arten, intermediäre Arten und stark reduzierte, chlorophylllose Arten umfaßt. Eine ähnliche Artenzusammensetzung findet sich bisher nur in der mykoparasitisch lebenden Orchideengattung *Corallorhiza*, die neben chlorophyllhaltigen, photosynthetisch aktiven Arten auch intermediäre und photosynthetisch inaktive Arten zu enthalten scheint. Die Physiologie und das Kodierungspotential dieser Arten ist jedoch bisher nicht näher beschrieben worden (Freudenstein & Doyle 1994).

In dem jüngsten Anpassungsstadium, *C. reflexa*, betreffen die Gendeletionen

wahrscheinlich nur die Untereinheiten der plastidären NADH-Dehydrogenase, einigen tRNAs und ribosomale Proteine. In der intermediären Art *C. gronovii* hat der Verlust der Untereinheiten der plastidär kodierten RNA-Polymerase Folgen für die Transkription plastidärer Gene. In der weißen Art *C. odorata* ist es durch den zusätzlichen Verlust der Photosynthesegene zum Verlust der Photosynthesefähigkeit gekommen, und es ist diese Art innerhalb der Gattung *Cuscuta* als am reduziertesten anzusehen.

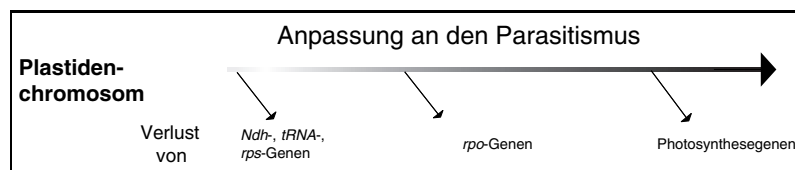


Abbildung 41 Zusammenfassung der Analysen zur Veränderung des plastidären Kodierungspotentials verschiedener *Cuscuta*-Arten in Anpassung an die parasitische Lebensweise.

5.2 Genexpression in der Gattung *Cuscuta*

Das plastidäre Kodierungspotential in den drei untersuchten *Cuscuta*-Arten umfaßt, wie auch aus physiologischen bzw. ultrastrukturellen Merkmalen ersichtlich ist (van der Kooji et al. 2000), eine Reduktionsreihe. Diese erstreckt sich von der grünen Art *C. reflexa* mit einem im Vergleich zu *N. tabacum* fast vollständigen Plastidenchromosom über die intermediäre Art *C. gronovii* bis zur weißen Art *C. odorata* mit einem stark reduzierten Plastidenchromosom, welches nur noch für wenige Gene kodiert.

Der Verlust der *rpo*-Gene in der intermediären *Cuscuta*-Art *C. gronovii* und der weißen Art *C. odorata* (Krause et al. 2003) hatte wichtige Konsequenzen für die Genexpression in den Plastiden dieser Arten. Erstaunlicherweise ist *C. gronovii* im Gegensatz zu *rpo*-Mutanten des Tabaks in der Lage, zu ergrünen und Photosynthese zu betreiben (van der Kooji et al. 2000). Es stellte sich deshalb die Frage, wie intermediäre *Cuscuta*-Arten, z.B. *C. gronovii* oder *C. subinclusa* den Verlust der PEP kompensieren konnten.

5.2.1 NEP-abhängige Transkription

Eine Möglichkeit, wie die intermediären *Cuscuta*-Arten den Verlust von PEP möglicherweise überbrücken konnten, liegt in der Anpassung der spezifischen Promotorstrukturen. Die meisten Photosynthesegene in nicht-parasitisch lebenden Pflanzen werden durch PEP von einem PEP-Promotor aus transkribiert (Hess & Börner 1999). Es stellte sich deshalb die Frage, wie die Transkription plastidärer Gene, die in nicht-parasitisch lebenden Pflanzen normalerweise durch die PEP transkribiert wurden, in PEP-defizienten *Cuscuta*-Arten durchgeführt wird. Anhand von Promotoranalysen des plastidären Haushaltsgenes *rrn16*, welches in nicht-parasitisch lebenden Pflanzen sowohl von einem NEP- als auch von einem PEP-Promotor transkribiert wird, zeigten, daß der Verlust der PEP mit dem Verlust des zugehörigen Promotors einherging. Die Transkription des Gens wurde in PEP-defizienten *Cuscuta*-Arten durch neu entstandene NEP-Promotoren kompensiert, von dem aus die Transkription initiiert (Krause et al. 2003).

Das Photosynthesegen *rbcl*, welches in nichtparasitisch lebenden Pflanzen, wie in *N. tabacum*, ausschließlich durch die PEP von einem PEP-Promotor aus transkribiert wird (Orozco et al. 1990), ist in den Arten *C. reflexa*, *C. gronovii* und *C. subinclusa* vorhanden und wird exprimiert, wohingegen es auf dem Plastidenchromosom der weißen, photosynthetisch inaktiven Art *C. odorata* fehlt (van der Kooji et al. 2000). Erhebliche Sequenzveränderungen in den Promotorbe-

reichen der intermediären *Cuscuta*-Arten belegen den völligen oder teilweisen Verlust des PEP-Promotors (Abb. 34). Durch *Primer-Extension*-Analysen konnte gezeigt werden, daß in *C. gronovii* und *C. subinclusa* an unterschiedlichen Stellen NEP-Promotoren entstanden sind, von denen aus die Transkription durch die NEP initiiert wird (Abb. 36, Abb. 38). Die durch die *Primer-Extension*-Analyse identifizierten Enden umfassen oberhalb des Transkriptionsstarts in allen Fällen ein „YRTA“-Motiv, welches als Erkennungssequenz für die NEP dient (Hübschmann & Börner 1998; Hess & Börner 1999; Liere & Maliga 1999; Weihe & Börner 1999). Außerdem wurde ein „GAA“-Motiv stromaufwärts des Promotors gefunden, welches als BoxI bzw. BoxII eine Rolle in der Promotorerkennung der NEP spielt (Xie & Allison 2002) (Abb. 39).

Den intermediären *Cuscuta*-Arten ist es somit anscheinend durch die Entstehung von spezifischen NEP-Promotoren in Genen, die zuvor ausschließlich durch PEP transkribiert wurden, ermöglicht, diese Gene nach dem Verlust von PEP durch NEP zu transkribieren. Eine ähnliche Situation zeigt sich im Fall des plastidären *atpB*-Gens, welches sowohl durch NEP als auch durch PEP von spezifischen Promotoren aus transkribiert wird. Vorläufige Daten zur Sequenz des *atpB*-Promotors in intermediären *Cuscuta*-Arten zeigen im Vergleich mit *C. reflexa* und mit der nicht-parasitisch lebenden Pflanze *N. tabacum*, daß die Sequenzen des PEP-Promotors deletiert sind, wohingegen NEP-Promotoren konserviert sind (Daten nicht gezeigt). Es ist anzunehmen, daß die Strategie des „Promotor-Switches“ in einer Vielzahl von plastidären Genen zu finden ist und daß Transkripte der Gene auf dem Plastidenchromosom so an vielen Stellen initiiert werden. Dadurch ist es den intermediären Arten ermöglicht, zu ergrünen und auf einem niedrigen Niveau Photosynthese zu betreiben.

Die tiefgreifenden Veränderungen an den Promotorstrukturen der intermediären *Cuscuta*-Arten sind jedoch unter Umständen von weitergehenden Veränderungen des plastidären Transkriptionsapparates begleitet, die es den Pflanzen letztendlich ermöglichen, ihre niedrige Photosyntheserate aufrecht zu erhalten. So wird die Entstehung von NEP-Promotoren in Photosynthesegenen, wie z.B. dem *rbcL*-Gen, auch in anderen parasitisch lebenden Pflanzen gefunden. So wird das Gen in *Lathraea clandestina* von einem NEP-Promotor aus transkribiert, welcher stromaufwärts des ursprünglichen PEP-Promotors liegt (Delavault et al. 1996). Die Pflanze kann zwar nicht ergrünen, aber es ist nicht auszuschließen, daß der Verlust der Photosynthesefähigkeit in diesem Fall in dem Verlust von anderen Photosynthesegenen begründet liegt. Möglich wäre, daß die Funktion der Rubisco in dieser Pflanze nicht in der Carboxygenase- bzw. Oxygenasefunktion des Enzyms zu suchen ist, sondern daß das Protein als Speichermolekül dient.

Diese Anpassungen des plastidären Transkriptionsapparates ermöglichte es den Pflanzen, trotz einer geringeren Transkription der Photosynthesegene durch die NEP, die geringere Transkriptmenge für die Translation der entsprechenden Proteine zu nutzen. Diese Anpassungen sind unter Umständen in Veränderungen von posttranskriptionalen Mechanismen zu finden, die an die Transkriptionsaktivität der NEP gekoppelt sein könnten. So zeigt die NEP-basierte Transkription der *rpo*-Mutanten aus Tabak, daß Veränderungen in der Prozessierung von Transkripten entstehen (Krause et al. 2000; Legen et al. 2002). Es akkumulieren in PEP-defizienten Tabakpflanzen die Transkripte der Gene *psaA* und *psaB* als polycistronisches Transkript, welches auch die Gene *ycf3* und *rps14* enthält. Die Transkription dieser Gene geht wahrscheinlich von einem möglichen NEP-Promotor stromaufwärts des *ycf3*-Genes aus (Summer et al. 2000), und nicht von dem PEP-Promotor oberhalb des *psaA*-Genes, welcher das tricistronische Transkript *psaA/psaB/rps14* generiert (Legen et al. 2002). Die durch die Gene *psaA* und *psaB* kodierten Proteine sind in den *rpo*-Mutanten nicht detektierbar. Somit ist für die Entstehung eines translatierbaren Transkriptes anscheinend auch entscheidend, ob das Gen durch die PEP oder die NEP transkribiert wurde. Das durch NEP generierte polycistronische Transkript wird nicht translatiert, da es nicht in der entsprechend prozessierten Form vorliegt.

Die Tatsache, daß sich polycistronische Transkripte schlecht oder gar nicht translatieren lassen, könnte auf eine mit den RNA-Polymerasen in Verbindung stehende Prozessierungsfunktion hindeuten. In tierischen Zellen ist ein carboxyterminales Ende der RNA-Polymerase II wahrscheinlich für das Spleißen, die Prozessierung des 3'-Endes und die Termination der Transkription verantwortlich (McCracken et al. 1997). Pfannschmidt et al. (2000) konnten PEP-assoziierte kernkodierte Proteine nachweisen, die eine Rolle in der Transkriptprozessierung spielen könnten. Krause (1999) zeigte, daß das sogenannte „Transkriptionsaktive Chromosom“ (TAC) das Herausspleißen von Intronsequenzen aus dem *petD*-Gene katalysiert. Bisanz et al. (2003) konnten zeigen, daß die *Arabidopsis*-Mutante *dal1-2*, die eine Mutation in der DAL-Sequenz trägt, einen negativen Effekt auf die Akkumulation von plastidärer RNA hat, da 5'- und 3'-Enden nicht modifiziert werden. Diese Ergebnisse verdeutlichen, daß die beiden Polymerasen innerhalb von Transkriptionskomplexen wahrscheinlich mit einer Vielzahl von anderen regulatorischen Proteinen, die z.B. eine Rolle in der Transkriptprozessierung haben, in Verbindung stehen.

Ob eine veränderte Transkriptprozessierung in den intermediären *Cuscuta*-Arten wirklich der Grund für eine bessere Translatierbarkeit von Transkripten im Vergleich zu beispielsweise *rpo*-Mutanten darstellt, kann durch die Hybridisierung von Gesamt-RNA aus dieser Pflanze mit DNA-spezifischen Sonden

plastidärer Gene ermittelt werden. Treten in diesen *Northern Blot*-Analysen keine größeren Transkripte auf, was z.B. in den *rpo*-Mutanten eine beeinträchtigte Transkriptprozessierung andeutet (Krause et al. 2000), so könnte dieses einen Hinweis auf eine Anpassung der Prozessierung in *C. gronovii* andeuten. Auch in der intermediären *Cuscuta*-Art zeigt sich zudem eine geringe Diskrepanz zwischen dem Kodierungspotential dieser Art und dem „Steady State“-RNA-Muster (Abb. 24, 30). Anhand von „Run on“-Analysen (Abb. 32) mit isolierten Plastiden aus der intermediären Art *C. gronovii* könnte festgestellt werden, ob NEP in dieser Pflanze dazu in der Lage ist, das gesamte verbleibende Plastidenchromosom zu transkribieren.

Es wurde die Existenz einer weiteren nukleär kodierten RNA-Polymerase für die Transkription des *rrn16*-Operons in Spinat beschrieben (Bligny et al. 2000). Diese RNA-Polymerase hat keinerlei Ähnlichkeit mit beschriebenen Polymerasen, und der von ihr benutzte Promotor fällt aus der bisherigen Klassifizierung von Promotorstrukturen heraus (Hess & Börner 1999). Der an der Transkription des *rrn16*-Operons beteiligte Promotor in Spinat ist in *C. gronovii* nicht identifiziert worden (Krause et al. 2003).

Eine weitergehende Analyse der NEP-abhängigen plastidären Transkription in den intermediären *Cuscuta*-Arten kann wichtige neue Erkenntnisse darüber liefern, welche Faktoren an den posttranskriptionalen Regulationsmechanismen beteiligt sein könnten (Mayfield et al. 1995; Schuster et al. 1999).

5.2.2 PEP-abhängige Transkription

Die grüne, photosynthetisch aktive Art *C. reflexa* besitzt im Gegensatz zu den beiden anderen *Cuscuta*-Arten sowohl eine NEP als auch eine PEP (Krause et al. 2003). Vergleicht man jedoch die stabilisierten plastidären RNA-Gehalte aller untersuchter Arten, so ist auffällig, daß das „Steady State“-RNA-Muster der grünen Art *C. reflexa* trotz erheblich größerem Kodierungspotential den Mustern der anderen beiden *Cuscuta*-Arten ähnelt (Abb. 30). Es ist zu vermuten, daß die in allen drei Arten gefundene Zusammensetzung der stabil vorliegenden RNAs zur Aufrechterhaltung des parasitischen Lebensstils ausreichend ist.

Aufgrund der erheblichen Diskrepanz zwischen dem Kodierungspotential des Plastidenchromosoms und des stabilisierten plastidären RNA-Musters in *C. reflexa*, stellte sich die Frage, ob das gesamte Plastidenchromosom dieser Art überhaupt transkribiert wird. Die Hybridisierung mit „Run on“-Transkripten zeigt, daß alle Bereiche der pDNA transkribiert werden (Abb. 32). Die Transkription der *rpo*-Gene und die Akkumulierung ihrer Transkripte konnte mittels „Dot Blot“-Hybridisierung von genspezifischen „sense“-Transkripten mit „Run

on“-Transkripten gezeigt werden (Abb. 33). Die Tatsache, daß PEP an der Transkription des Plastidenchromosoms beteiligt ist, zeigt sich zudem in der starken Konservierung von PEP-Promotoren, wie im *rbcL*-Gen oder *psbD*-Operon. *Primer Extension*-Analysen des *rbcL*-Genes konnten außerdem zeigen, daß dieses Gen wie in nicht-parasitischen Pflanzen von einem PEP-Promotor aus initiiert wird (Orozco et al. 1990).

Die Transkription von Photosyntheseegenen durch die PEP könnte eine der Ursachen für die größere Photosyntheseaktivität und den höheren Chlorophyllgehalt von *C. reflexa* in Vergleich zu *C. gronovii* sein (van der Kooji et al. (2000) und Abb. 3). Umso erstaunlicher ist die Tatsache, daß das stabile plastidäre RNA-Muster den Mustern der *Cuscuta*-Arten ähnelt, denen für die plastidäre Transkription nur die NEP zur Verfügung steht. Nur ein Bruchteil der plastidären Transkripte wird in *C. reflexa* stabilisiert (Abb. 31), unter diesen einige tRNAs und rRNAs, nicht aber die mRNAs von Photosyntheseegenen. Dieses Ergebnis steht in starkem Kontrast zu den Untersuchungen z.B. von Baumgartner et al. (1993) an *Hordeum vulgare* und Legen et al. (2002) an Wildtyp Tabakpflanzen, in denen eine starke Akkumulation der Transkripte *psbA*, *psbC*, *psbD* und *rbcL* zu finden ist, und könnte darauf hindeuten, daß eine veränderte Stabilität der Transkripte von Photosyntheseegenen charakteristisch für parasitisch lebende Pflanzen wie *C. reflexa* sein könnte.

Die plastidäre Genexpression wird hauptsächlich auf posttranskriptionaler Ebene, z.B. durch die Degradation oder die Stabilisierung von RNAs, reguliert (Gruissem & Tonkyn 1993; Schuster et al. 1999). Außerdem besteht kein unmittelbarer Zusammenhang zwischen Transkriptionsrate, Akkumulation eines Transkriptes und der Menge des entsprechenden Proteines (Legen et al. 2002; Eberhard et al. 2002). *C. reflexa* kann trotz einer geringen Stabilität und Menge von mRNAs der Photosyntheseegene, Photosynthese auf einem sehr niedrigen Niveau betreiben (van der Kooji et al. 2000). Möglich ist, daß PEP in den Chloroplasten von *C. reflexa* zwar die Transkription von Photosyntheseegenen durchführt, daß jedoch assoziierte Proteine, die in nicht-parasitisch lebenden Pflanzen mit dem Transkriptionskomplex assoziiert und für die Stabilisierung oder Prozessierung von Transkripten verantwortlich sind, in *C. reflexa* deletiert sind.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß das „parasitenspezifische“ RNA-Muster von *C. reflexa* und die hohe Umsatzrate von Transkripten von Photosyntheseegenen ein weiteres Indiz sein könnte, daß es sich bei dieser Pflanze um ein „Übergangsstadium“ handelt. Denkbar wäre, daß die Transkription durch die PEP an Bedeutung verliert und möglicherweise mit dem Transkriptionskomplex assoziierte kernkodierte Proteine, die für die Prozessierung von Tran-

skripten wichtig sind, verlorengegangen sind. *C. reflexa*, in der die plastidäre Transkription durch PEP eine immer weniger wichtige Rolle einnimmt, könnte somit als Vorläuferstadium in Bezug auf die intermediären *Cuscuta*-Pflanzen angesehen werden, in denen die PEP vollständig deletiert ist.

Die Abbildung 42 faßt die durchgeführten Untersuchungen der Analyse der plastidären Genexpression und der Veränderungen an Promotorstrukturen in Arten der Gattung *Cuscuta* noch einmal zusammen. Die grüne Art *C. reflexa* besitzt sowohl eine PEP als auch eine NEP für die Transkription von plastidären Genen, und funktionelle PEP-Promotoren zeigen, daß PEP in dieser Pflanze einige Gene transkribiert. Die Stabilität von Transkripten in *C. reflexa*, die sehr der intermediären Art *C. gronovii* und der weißen Art *C. odorata* ähnelt, deutet jedoch darauf hin, daß es sich bei dieser Art unter Umständen um ein Übergangsstadium zwischen nicht-parasitisch lebenden Pflanzen und Parasitenpflanzen handeln könnte. Die intermediäre Art *C. gronovii* kann trotz des Verlustes von PEP ergrünen. Eine Möglichkeit, daß die NEP die Transkription von Photosyntheseorganen übernimmt, liegt in der Anpassung der Promotorstrukturen, eine zusätzliche unter Umständen in einer Anpassung von posttranskriptionellen Mechanismen. Eine ähnliche Situation findet sich in Plastiden der weißen Art *C. odorata*. Hier beruht der Verlust der Photosynthesefähigkeit jedoch auf dem Verlust der relevanten Gene. Es stellt sich die Frage, warum Transkription in den extrem reduzierten Plastiden dieser Pflanze aufrechterhalten wird.

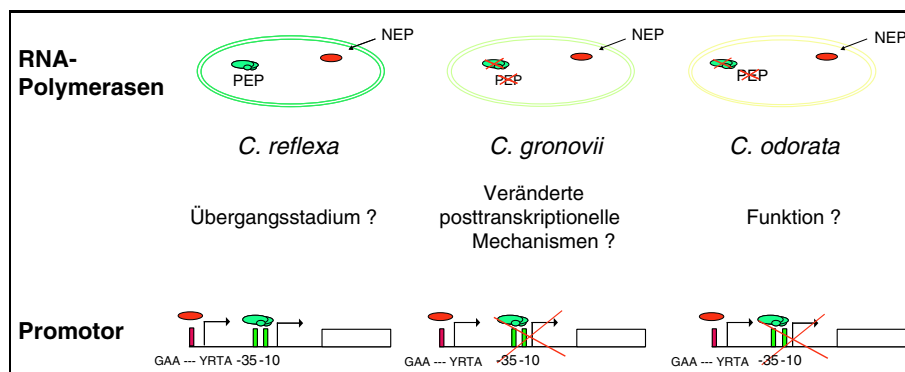


Abbildung 42 Zusammenfassung der Veränderung von plastidärer Transkription und Promotorsequenzen im Zuge der Anpassung verschiedener *Cuscuta*-Arten an die parasitische Lebensweise.

6 Ausblick

Die in dieser Arbeit analysierten *Cuscuta*-Arten stellen jede für sich ein interessantes Entwicklungsstadium in der Anpassung an die parasitische Lebensweise dar. Durch die Existenz von stabilen Entwicklungsstadien läßt sich der evolutionäre Verlust der *rpo*-Gene und der Photosynthesegene anhand von noch lebenden Arten nachvollziehen. Unterschiedliche Entwicklungsstadien von Arten aus verschiedenen Pflanzenfamilien stellen zumeist ein momentan stabiles Endstadium der Entwicklung dar, so daß der unmittelbare Vergleich mit anderen Evolutionsstufen fehlt. Die Möglichkeit, die evolutionären Anpassungen an die parasitische Lebensweise an rezenten Arten ein und derselben Gattung studieren zu können, macht die besondere Bedeutung von *Cuscuta* aus.

Bei der grünen, photosynthetisch aktiven Art *C. reflexa* handelt es sich höchstwahrscheinlich um ein junges Anpassungsstadium an die parasitische Lebensweise. Die vielen Homologien zum Plastidenchromosom von *N. tabacum* deuten darauf hin. Es ist aber auch denkbar, daß es sich hierbei um ein „Übergangsstadium“ handelt, welches ähnlich wie ein Vorläufer der intermediären *Cuscuta*-Arten auf dem Weg dahin ist, die *rpo*-Untereinheiten und damit eine funktionale PEP zu verlieren. Die Vervollständigung der Sequenz des Plastidenchromosoms wird weitere Aufschlüsse über die Konservierung der *rpo*-Gene in *C. reflexa*, den Erhalt weiterer Plastidengene und regulativer Sequenzen geben. Weiterführende biochemische Analysen an *C. reflexa* können Hinweise über die Zusammensetzung der plastidären RNA-Polymerase liefern und im Vergleich zu nicht-parasitisch lebenden Pflanzen neue Erkenntnisse über mit dem Transkriptionskomplex assoziierte Faktoren ergeben. Mögliche Veränderungen bzw. Deletionen von kernkodierten, assoziierten Transkriptionsfaktoren deuten darauf hin, daß in Anpassung an die parasitische Lebensweise auch Veränderungen im Kerngenom der Parasiten zu vermuten sind, die sich auf die plastidären Funktionen des Parasiten auswirken. DNA-Sonden von nukleär kodierten Proteinen, besonders solche, die eine Rolle für die plastidäre Transkription spielen, können hier durch Hybridisierung mit Gesamt-RNA aus *C. reflexa* Aufschluß über Veränderungen oder Deletionen im Kern in Anpassung an die parasitische

Lebensweise geben. So wurden die Auswirkungen im Licht und im Dunkeln angezogener Keimlinge von *Arabidopsis thaliana* auf die Genexpression kernkodierter Plastidenproteine durch Hybridisierung von Gesamt-RNA aus den verschiedenen Stadien mit einem Array aus 1800 genspezifischen Sonden analysiert (Kurth et al. 2002). Ein ähnlicher Versuchsansatz würde sich auch ausgezeichnet für die Analyse der Auswirkungen der parasitischen Lebensweise auf kernkodierte Plastidenproteine eignen, und zwar zum einen in einem Vergleich mit nicht-parasitisch lebenden Pflanzen und zum anderen in einem Vergleich mit anderen *Cuscuta*-Arten.

Die intermediäre Art *C. gronovii* kann, obwohl die plastidäre Transkription ausschließlich durch die NEP durchgeführt wird, ergrünen und Photosynthese betreiben, welches in starkem Kontrast zu Erkenntnissen über künstliche *rpo*-Mutanten steht und in dieser Konstellation auch noch nicht für parasitisch lebende Pflanzen beschrieben worden ist. Interessant wäre in diesem Zusammenhang die Analyse von Veränderungen der posttranskriptionellen Mechanismen der Genexpression und der Proteine, die an dieser Prozessierung beteiligt sein könnten. Auch hier bietet sich die Untersuchung von Kernproteinen an, die an posttranskriptionalen Mechanismen beteiligt sind. Die Untersuchung weiterer Promotorstrukturen von Photosyntheseegenen, z.B. der durch einen Blaulicht induzierten Faktor aktivierte Promotor des *psbD/psbC*-Operons in intermediären *Cuscuta*-Arten, könnte weitere Hinweise auf die reduzierte Photosyntheserate dieser Arten in Vergleich zu *C. reflexa* liefern.

Die weiße Art *C. odorata* stellt mit den photosynthetisch inaktiven, weißen Plastiden die am meisten reduzierte Art der Gattung dar. Die stark reduzierten Plastiden, die keine Photosynthese mehr betreiben können, sind ein ideales Modell für die Analyse der verbleibenden plastidären Funktionen und der Funktion bisher noch nicht identifizierter Leserahmen. So ist es wichtig, ausgehend von den Ergebnissen der in dieser Arbeit durchgeführten *Southern Blot*-Analysen, das Vorhandensein der verbleibenden Proteingene wie *accD*, *clpP*, *ycf1* und *ycf2* noch einmal zu verifizieren. Die Bestimmung der gesamten Sequenz des Plastidenchromosoms von *C. odorata* und der Vergleich mit dem stark reduzierten Plastidenchromosom von *E. virginiana* könnte wichtige Hinweise darauf geben, ob in *C. odorata* die Funktion der Plastiden noch stärker reduziert ist. Auch der Nachweis einer funktionellen Proteinsynthese ist wichtig, um sicherzustellen, daß das verbleibende Plastidenchromosom noch exprimiert wird. Dieses könnte z.B. durch *Western Blot*-Analysen der noch auf dem Plastidenchromosom vorhandenen Proteine wie *clpP* oder *accD* oder den Nachweis von funktionellen Ribosomen erbracht werden.

7 Zusammenfassung

Die parasitische Blütenpflanzengattung *Cuscuta* (Cuscutaceae) umfaßt Pflanzenarten, die sich in unterschiedlichem Ausmaß an die parasitische Lebensweise angepaßt haben. Die grüne, photosynthetisch aktive Art *C. reflexa*, die intermediäre Art *C. gronovii* und die weiße, chlorophylllose Art *C. odorata* standen im Mittelpunkt der Analysen dieser Arbeit. Auf morphologischer, physiologischer und zellulärer Ebene haben umfangreiche Reduktionen stattgefunden, aber wenig war zu Beginn dieser Arbeit über plastidäre Genome bekannt.

Die Auswirkungen der parasitischen Lebensweise auf das Kodierungspotential des Plastidenchromosoms, auf den plastidären Transkriptionsapparat und auf plastidäre Promotorstrukturen wurden untersucht. Um das Kodierungspotential der Plastidenchromosomen in den drei *Cuscuta*-Arten näher zu analysieren, wurde die pDNA der grünen Art *C. reflexa* zum größten Teil kloniert und sequenziert. Sequenzvergleiche mit der nicht-parasitisch lebenden Art *N. tabacum* verdeutlichten, daß sich auf Sequenzebene viele Merkmale nicht-parasitischer Pflanzen finden. Gendeletionen konnten für die Untereinheiten des NADH-Dehydrogenase-Komplexes, für ribosomale Proteine und tRNAs festgestellt werden.

Zur Abschätzung des Kodierungspotentials des Plastidenchromosoms weiterer *Cuscuta*-Arten wurde ein DNA-Filter, welcher das gesamte Plastidenchromosom von *N. tabacum* enthielt, sukzessiv mit angereicherter pDNA, die als Sonde diente, aus der grünen Art *C. reflexa*, der intermediären Art *C. gronovii* und der weißen Art *C. odorata* hybridisiert. Die Hybridisierungen zeigten eine deutliche Reduktionsreihe des Kodierungspotentials. Anhand dieser *Southern Blot*-Hybridisierungen wird das Plastidenchromosom der grünen Art *C. reflexa*, das am wenigsten reduzierte Chromosom, auf ca. 110 kb geschätzt. Das Plastidenchromosom der intermediären Art *C. gronovii* wird auf ca. 80 kb geschätzt, das der weißen *C. odorata* auf ca. 50 kb.

Der Arbeit vorangehende Analysen zeigten, daß die Untereinheiten der plastidär kodierten RNA-Polymerase (PEP) in den intermediären und weißen Arten nicht mehr vorhanden sind. In nicht-parasitisch lebenden Pflanzen führt PEP-Defizienz zum Verlust der Photosynthesefähigkeit, nicht jedoch in intermediären *Cuscuta*-Arten. Die *Primer-Extension*-Analysen des Photosynthesegens

rbcL an einer grünen und zwei intermediären *Cuscuta*-Arten verdeutlicht die molekularen Ursachen der Ergrünungsfähigkeit der intermediären Arten. Das Photosynthesegen *rbcL* wird in *N. tabacum* und der grünen Art *C. reflexa* von einem σ^{70} „-10“ / „-35“-ähnlichem Promotor aus initiiert, der charakteristisch für die Promotoren der PEP ist. In den intermediären *Cuscuta*-Arten sind neue spezifische NEP-Promotoren entstanden, die die Transkription von Photosynthesegenen durch die NEP ermöglichen.

In der weißen Art *C. odorata* fehlen neben den *rpo*-Genen eine Vielzahl von Photosynthesegenen. Der Erhalt des Plastidenchromosoms in dieser Art wird möglicherweise durch das *accD*-Gen und/oder das *clpP*-Gen und weitere essentielle Gene unbekannter Funktion (*ycf1*, *ycf2*) gerechtfertigt.

Sukzessive Hybridisierungen des Filters mit der pDNA von *N. tabacum* mit Gesamt-RNA aus den verschiedenen *Cuscuta*-Arten als Sonde zeigten, daß sich die „Steady State“-RNA-Muster der Arten sehr ähneln. In *C. reflexa* repräsentiert dieses Muster nur einen kleinen Teil des Kodierungspotentials des Plastidenchromosoms. Eine Hybridisierung des Filters mit der pDNA von Tabak und eines „Dot Blot“-Filters mit ausgewählten Plastiden-DNA-Fragmenten, in der „Run on“-Transkripte als Sonde eingesetzt wurden, konnte jedoch nachweisen, daß alle Teile des Plastidenchromosoms von *C. reflexa* transkribiert werden. Es wird jedoch nur ein kleiner „parasiten-spezifischer“ Teil der Transkripte stabilisiert. Aufgrund der Diskrepanz zwischen Transkriptions- und RNA-Muster und der im Vergleich zu nicht-parasitisch lebenden Pflanzen modifizierten Transkriptstabilität ist es denkbar, daß posttranskriptionale Mechanismen in *C. reflexa* stark verändert sein könnten. Zusätzlich wäre es möglich, daß die Transkription plastidärer Gene durch PEP in *C. reflexa* zwar noch stattfindet, jedoch im Vergleich zu nicht-parasitisch lebenden Pflanzen eine weniger wichtige Rolle übernehmen könnte.

Summary

The angiosperm genus *Cuscuta* (Cuscutaceae) comprises a range of species that have all adapted to a parasitic lifestyle in various degrees. The chlorophyllous, photosynthetically active species *C. reflexa*, the intermediate species *C. gronovii* and the white, achlorophyllous species *C. odorata* were analysed in this study. There is a wide range of adaptations at the ultrastructural and physiological levels but only little was known about the degree of adaptation of plastid coding capacity at the beginning of this study.

The influence of parasitism on the plastid coding capacity, the plastid transcriptional apparatus and plastid promoter structures were investigated. To analyse the coding capacity of the plastid chromosome in the three different *Cuscuta* species large fragments of the pDNA of *C. reflexa* were cloned and sequenced. Sequence comparisons with the non-parasitic plant *N. tabacum* revealed that *C. reflexa* has conserved many features of non-parasitic plants in its plastid coding sequence and therefore resembles a young stage of adaptation to the parasitic lifestyle. Gene deletions were found for the subunits of the NADH-dehydrogenase-complex, for ribosomal proteins and for tRNAs.

To estimate the coding capacity of the plastid chromosomes of the analysed *Cuscuta*-species, pDNA was radioactively labelled and successively hybridized to a filter containing fragments of the whole plastid chromosome from *N. tabacum*. While extensive deletions have taken place in the pDNA of the achlorophyllous species *C. odorata*, the green species *C. reflexa* has retained an almost complete genome. The pDNA of *C. reflexa* was estimated to be 110 kb, the pDNA of *C. gronovii* 80 kb and the pDNA of *C. odorata* 50 kb. Previous results had shown that the latter two species have lost the subunits of the plastid encoded RNA-polymerase. Although the plastid genome of the intermediate species *C. gronovii* has suffered extensive deletions, in contrast to the plastid genome of *C. odorata* it has retained photosynthesis related genes. In contrast to intermediate *Cuscuta*-species PEP-deficiency in non-parasitic plants causes the loss of photosynthesis. Primer-Extension-analysis of the photosynthesis gene *rbcL* with the green species *C. reflexa* and two intermediate *Cuscuta*-species revealed a possi-

Summary

ble mechanism for the ability to retain photosynthesis. In the non-parasitic plant *N. tabacum* and the green *Cuscuta*-species *C. reflexa* the gene is transcribed from a specific σ^{70} „-10“ / „-35“ PEP promoter. In intermediate *Cuscuta*-species a sequence characteristic for NEP-promoters has evolved which makes it possible for the nuclear encoded RNA-polymerase to transcribe this gene.

The white species *C. odorata* has lost many photosynthesis genes next to the *rpo*-genes. The *accD*- and/or *clpP*-gene next to essential genes of unknown function (*ycf1*, *ycf2*) might be the reason for *C. odorata* to maintain a plastid chromosome.

Successive hybridizations of the same filter with radioactively 3'-labelled RNA isolated from the three *Cuscuta*-species revealed that in all three species only a small „parasite-specific“ portion of the plastid genome consisting mainly of rRNAs and tRNAs is represented at the level of steady state RNA. Run-on transcription assays revealed that in plastids of *C. reflexa* the entire genome is transcribed. Hence, the subset of RNA species required for a parasitic lifestyle is preferentially stabilized in *Cuscuta* species. The discrepancy between the run-on and steady-state analysis might be hint to alterations in RNA processing or transcript stabilization. Additionally it might be the case that transcription of genes through PEP still occurs in *C. reflexa* but is less important than in non-parasitic plants.

Literatur

- Alexander, C., Faber, N. & Klaff, P. (1998). Characterisation of protein-binding to the spinach chloroplast *psbA* mRNA 5' untranslated region. *Nucl. Acids Res.*, **26**: 2265–2272.
- Allen, J. (2003). The function of genomes in bioenergetic organelles. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, **358**: 19–38.
- Allison, L. (2000). The role of sigma factors in plastid transcription. *Biochemie*, **82**: 537–548.
- Allison, L., Simon, L. & Maliga, P. (1996). Deletion of *rpoB* reveals a second distinct transcription system in plastids of higher plants. *EMBO J.*, **15**: 2802–2809.
- Altschul, S., Madden, T., Schäfer, A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl. Acids Res.*, **25**: 3389–3402.
- Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R., Moore, D., Seidman, J., Smith, J. & Struhl, K. (1994–96). *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, London.
- Baginsky, S., Tiller, K. & Link, G. (1997). Transcription factor phosphorylation by a protein kinase associated with chloroplast RNA polymerase from mustard (*Sinapis alba*). *Plant Mol. Biol.*, **34**: 181–189.
- Bandall, D. & Manasse, R. (1995). Cyclic photophosphorylation and electron transport. *Biochim. Biophys. Acta*, **1229**: 23–38.
- Barkan, A. (1989). Tissue-dependent plastid RNA splicing in maize: Transcripts from four plastid genes are predominantly unspliced in leaf meristems and roots. *Plant Cell*, **1**: 437–445.
- Baumgartner, B., Rapp, J. & Mullet, J. (1993). Plastid genes encoding the transcription/translation apparatus are differentially transcribed ear-

- ly in barley (*Hordeum vulgare*) chloroplast development (evidence for selective stabilization of *psbA* mRNA). *Plant Physiol.*, **101**: 781–791.
- Bennoun, P. (1982). Evidence for a respiratory chain in the chloroplast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**: 4352–4356.
- Birnboim, H. & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.*, **7**: 1513–1523.
- Bisanz, C., Begot, L., Carol, P., Perez, P., Bligny, M., Pesey, H., Gallois, J., Lerbs-Mache, S. & Mache, R. (2003). The Arabidopsis nuclear DAL gene encodes a chloroplast protein which is required for the maturation of the plastid ribosomal RNAs and is essential for chloroplast differentiation. *Plant Mol. Biol.*, **51**: 651–663.
- Bligny, M., Courtois, F., Thamin, S., Chang, C.-C., Lagrange, T., Baruah-Wolff, J., Stern, D. & Lerbs-Mache, S. (2000). Regulation of plastid rDNA transcription by interaction of CDF2 with two different RNA polymerases. *EMBO J.*, **19**: 1851–1860.
- Bömmer, D., Haberhausen, G. & Zetsche, K. (1993). A large deletion in the plastid DNA of the holoparasitic flowering plant *Cuscuta reflexa* concerning two ribosomal proteins (*rpl2*, *rpl23*), one transfer RNA (*trnI*) and an ORF 2280 homologue. *Curr. Genet.*, **24**: 171–176.
- Bünger, W. & Feierabend, J. (1980). Capacity for RNA synthesis in 70S ribosome-deficient plastids of heat-bleached rye-leaves. *Planta*, **149**: 163–169.
- Bock, R., Hermann, M. & Kössel, H. (1996). In vivo dissection of cis-acting determinants for plastid RNA editing. *EMBO J.*, **15**: 5052–5059.
- Bradley, D. & Gatenby, A. (1985). Mutational analysis of the maize chloroplast ATPase β -subunit gene promoter: the isolation of promoter mutants in *E.coli* and their characterization in a chloroplast *in vitro* transcription system. *EMBO J.*, **4**: 3641.
- Börner, T., Hedtke, B., Hess, W., Legen, J., Herrmann, R. & Weihe, A. (1999). Phage-type RNA polymerases in higher plants. *Argyroudi, J.H. and Senger, H. (Eds.). The Chloroplast: From molecular biology to biotechnology, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht: 73–78.*
- Burrows, P., Sazanov, L., Svab, Z., Maliga, P. & Nixon, P. (1998). Identification of a functional respiratory complex in chloroplasts through analysis of tobacco mutants containing disrupted plastid *ndh* genes. *EMBO J.*, **17**: 868–876.

- Cermakian, N., Ikeda, T., Cedergren, R. & Gray, M. (1996). Sequences homologous to yeast mitochondrial and bacteriophage T3 and T7 RNA polymerases are widespread throughout the eukaryotic lineage. *Nucl. Acids Res.*, **24**: 648–654.
- Cerutti, H., Johnson, A., Boynton, J. & Gilham, N. (1995). Inhibition of chloroplast DNA recombination and repair by dominant negative mutants of *Escherichia coli* RecA. *Mol. Cell. Biol.*, **15**: 3003–3011.
- Chang, C.-C., Sheen, J., Bligny, M., Niwa, Y., Lerbs-Mache, S. & Stern, D. (1999). Functional analysis of two maize cDNAs encoding T7-like RNA polymerases. *Plant Cell*, **11**: 911–926.
- Chirgwin, J., Przybyla, A., Macdonald, R. & Rutter, W. (1979). Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry*, **18**: 5294–5299.
- Choquet, Y. & Wollman, F.-A. (2002). Translational regulations as specific traits of chloroplast gene expression. *FEBS Lett.*, **529**: 39–42.
- Christopher, D. (1996). Leaf development and phytochrome modulate the activation of *psbD-psbC* transcription by highfluorescence blue light in barley chloroplasts. *Photosynth. Res.*, **47**: 239–251.
- Christopher, D. & Hoffer, P. (1998). DET1 represses a chloroplast blue-light-responsive promoter in a developmental and tissue-specific manner in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, **14**: 1–11.
- Christopher, D. & Mullet, J. (1994). Separate photosensory pathways co-regulates blue light/ultraviolet-A-activated *psbD-psbC* transcription and light-induced D2 and CP43 degradation in barley (*Hordeum vulgare*) chloroplasts. *Plant Physiol.*, **104**: 1119–1129.
- Danon, A. (1997). Translational regulation in the chloroplast. *Plant Physiol.*, **115**: 1293–1298.
- Danon, A. & Mayfield, S. (1994). Light-regulated translation of chloroplast mRNAs through redox potential. *Science*, **266**: 1717–1719.
- Dawson, J., Musselman, L., Wolswinkel, P. & Dörr, I. (1994). Biology and control of *Cuscuta*. *Rev. Weed Sci.*, **6**: 265–317.
- De Santis-Maciossek, G., Kofer, W., Bock, A., Schoch, S., Maier, R., Wanner, G., Rüdiger, W., Koop, H.-U. & Herrmann, R. (1999). Targeted disruption of the plastid RNA polymerase genes *rpoA*, *B* and *C1*: molecular biology, biochemistry and ultrastructure. *Plant J.*, **18**: 477–489.

- Delavault, P., Russo, N., Lusson, N. & Thalouarn, P. (1996). Organization of the reduced plastid genome of *Lathraea clandestina* an achlorophyllous parasitic plant. *Physiol. Plantarum*, **96**: 674–682.
- Delavault, P. & Thalouarn, P. (1994). Plastid genome evolution in Orobanchaceae and other holoparasites. *Proceedings of the 3rd International Workshop on Orobanche and related Striga research*.
- Deng, X.-W. & Gruissem, W. (1987). Control of plastid gene expression during development: limited role of transcriptional regulation. *Cell*, **49**: 379–387.
- DePamphilis, C. & Palmer, J. (1990). Loss of photosynthetic and chlororespiratory genes from the plastid genome of a parasitic flowering plant. *Nature*, **348**: 337–339.
- Doetsch, N., Thompson, M., Favreau, M. & Hallick, R. (2001). Comparison of *psbK* operon organization and group III intron content in chloroplast genomes of 12 Euglenoid species. *Mol. Gen. Genet.*, **264**(5): 682–690.
- Douglas, S. & Penny, S. (1999). The plastid genome of the cryptophyte alga, *Guillardia theta*: complete sequence and conserved synteny groups confirm its common ancestry with red algae. *J. Mol. Evol.*, **48**: 236–244.
- Drescher, A., Ruf, S., Calsa, T. J., Carrer, H. & Bock, R. (2000). The two largest chloroplast genome-encoded open reading frames of higher plants are essential genes. *Plant J.*, **22**: 97–104.
- Dörr, I. (1987). The haustorium of *Cuscuta* - new structural results. In: *H.Chr. Weber and W.Forstreuter, eds. Parasitic Flowering Plants, Marburg, Germany*: 163–170.
- Dörr, I. (1990). Sieve elements in haustoria of parasitic angiosperms. In: *H.-D. Behnke and R.D. Sjolung, eds. Sieve Elements. Springer-Verlag, Berlin*: 239–256.
- Eberhard, S., Drapier, D. & Wollmann, F. (2002). 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**: 149–160.
- Eibl, C., Zou, Z., Beck, A., Kim, M., Mullet, J. & Koop, H. (1999). In vivo analysis of plastid *psbA*, *rbcL* and *rpl32* URT elements by chloroplast transformation: tobacco plastid gene expression is controlled by

- modulation of transcript levels and translation efficiency. *Plant J.*, **19**: 333–345.
- Embley, T., van der Giezen, M., Horner, D., Dyal, P. & Foster, P. (2003). Mitochondria and hydrogenosomes are two forms of the same fundamental organelle. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, **358**: 193–203.
- Ems, S., Morden, C., Dixon, C., Wolfe, K., dePamphilis, C. & Palmer, J. (1995). Transcription, splicing and editing of plastid RNAs in the non-photosynthetic plant *Epifagus virginiana*. *Plant Mol. Biol.*, **29**: 721–733.
- Falk, J., Schmidt, A. & Krupinska, K. (1993). Characterization of plastid DNA transcription in ribosome deficient plastids of heat-bleached barley leaves. *J. Plant Physiol.*, **141**: 176–181.
- Fischer, N., Stampacchia, O., Redding, K. & Rochaix, J. (1996). Selectable marker recycling in the chloroplast. *Mol. Gen. Genet.*, **251**: 373–380.
- Freudenstein, J. & Doyle, J. (1994). Charakter transformation and relationships in *Corallorhiza* (Orchidaceae: Epidendroideae). I. Plastid DNA. *Am. J. Bot.*, **81**: 1449–1457.
- Freyer, R., Neckermann, K., Maier, R. & Kössel, H. (1995). Structural and functional analysis of plastid genomes from parasitic plants: loss of an intron within the genus *Cuscuta*. *Curr. Genet.*, **27**: 580–586.
- Gamble, P. & Mullet, J. (1989). Blue light regulates the accumulation of two *psbD-psbC* transcripts in barley chloroplasts. *EMBO J.*, **8**: 2785–2794.
- Glöckner, G., Rosenthal, A. & Valentin, K. (2000). The structure and gene repertoire of an ancient red algal plastid genome. *J. Mol. Evol.*, **51**: 382–390.
- Gockel, G. & Hachtel, W. (2000). Complete gene map of the plastid genome of the nonphotosynthetic euglenoid flagellate *Astasia longa*. *Protist*, **151**: 347–351.
- Gray, M. (1989). The evolutionary origins of organelles. *Trends Genet.*, **5**: 294–299.
- Greenleaf, A., Kelly, J. & Lehman, I. (1986). Yeast *RPO41* gene product is required for transcription and maintenance of the mitochondrial genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**: 3391–3394.
- Gruber, T., Markov, D., Sharp, M., Young, B., Lu, C., Zhong, H., Artsimovitch, I., Geszvain, K., Arthur, T., Burgess, R., Landick, R., Severinov,

- K. & Gross, C. (2001). Binding of the initiation factor sigma(70) to core RNA polymerase is a multistep process. *Mol. Cell*, **8**: 21–31.
- Gruissem, W., Greenberg, B., Zurawski, G. & Hallick, R. (1986). Chloroplast gene expression and promoter identification in chloroplast extracts. *Methods Enzymol.*, **118**: 253–270.
- Gruissem, W., Narita, J., Greenberg, B., Zurawski, G., Prescott, D. & Hallick, R. (1983). Selective *in vitro* transcription of chloroplast genes. *J. Cell. Biochem.*, **22**: 31–46.
- Gruissem, W. & Tonkyn, J. (1993). Control mechanisms of plastid gene expression. *Crit. Rev. Plant Sci.*, **12**: 19–55.
- Haberhausen, G., Valentin, K. & Zetsche, K. (1992). Organization and sequence of photosynthetic genes from the plastid genome of the holoparasitic flowering plant *Cuscuta reflexa*. *Mol. Gen. Genet.*, **232**: 154–161.
- Haberhausen, G. & Zetsche, K. (1994). Functional loss of all *ndh* genes in an otherwise relatively unaltered plastid genome of the holoparasitic flowering plant *Cuscuta reflexa*. *Plant Mol. Biol.*, **24**: 217–222.
- Hajdukiewicz, P., Allison, L. & Maliga, P. (1997). The two RNA polymerases encoded by the nuclear and the plastid compartments transcribe distinct groups of genes in tobacco. *EMBO J.*, **16**: 4041–4048.
- Hakimi, M.-A., Privat, I., Valay, J.-G. & Lerbs-Mache, S. (2000). Evolutionary conservation of C-terminal domains of primary sigma 70-type transcription factors between plants and bacteria. *J. Biol. Chem.*, **275**: 9215–9221.
- Hallick, R., Hong, L., Drager, R., Favreau, M., Monfort, A., Orsat, B., Spielmann, A. & Stutz, E. (1993). Complete Sequence of *Euglena gracilis* chloroplast DNA. *Nucl. Acids Res.*, **21**: 3537–3544.
- Hallick, R., Lipper, C. & Richards, O. (1976). Isolation of a transcriptionally active chromosome from chloroplasts of *Euglena gracilis*. *Biochem.*, **15**: 3039–3045.
- Hübschmann, T. & Börner, T. (1998). Characterisation of transcript initiation sites in ribosome-deficient barley plastids. *Plant Mol. Biol.*, **36**: 493–496.
- Hedtke, B., Börner, T. & Weihe, A. (1997). Mitochondrial and chloroplast phage-type RNA polymerases in *Arabidopsis*. *Science*, **277**: 809–811.

- Hedtke, B., Börner, T. & Weihe, A. (2000). One RNA polymerase serving two genomes. *EMBO Rep.*, **1**: 435–440.
- Hedtke, B., Legen, J., Weihe, A., Herrmann, R. & Börner, T. (2002). Six active phage-type RNA polymerase genes in *Nicotiana tabacum*. *Plant J.*, **30**: 625–637.
- Hedtke, B., Meixner, M., Gillandt, S., Richter, E., Börner, T. & Weihe, A. (1999). Green fluorescent protein as a marker to investigate targeting of organellar RNA polymerases of higher plants *in vivo*. *Plant J.*, **17**: 557–561.
- Heins, L., Collinson, I. & Soll, J. (1998). The protein translocation apparatus of chloroplast envelopes. *Trends Plant Sci.*, **3**: 56–61.
- Heins, L. & Soll, J. (1998). Chloroplast biogenesis: Mixing the prokaryotic and the eukaryotic? *Curr. Biol.*, **8**: 215–217.
- Herrmann, R. (1997). Eukaryotism, towards a new interpretation. *Eukaryotism and Symbiosis*: 73–118.
- Herrmann, R., Westhoff, P. & Link, G. (1992). Biogenesis of plastids in higher plants. *Cell Organelles*: 276–349.
- Hess, W. & Börner, T. (1999). Organellar RNA polymerases of higher plants. *Int. Rev. Cytol.*, **190**: 1–59.
- Hess, W., Prombona, A., Fieder, B., Subramanian, A. & Börner, T. (1993). Chloroplast *rps15* and the *rpoB/C1/C2* gene cluster are strongly transcribed in ribosome-deficient plastids: evidence for a functioning non-chloroplast-encoded RNA polymerase. *EMBO J.*, **12**: 563–571.
- Hibberd, J., Bungard, R., Press, M., W.D., J., Scholes, J. & Quick, W. (1998). Localization of photosynthetic metabolism in the parasitic angiosperm *Cuscuta reflexa*. *Planta*, **205**: 506–513.
- Hiratsuka, J., Shimada, H., Whittier, R., Isibashi, T., Sakamoto, M., Mori, M., Kondo, C., Honji, Y., Sun, C.-R., Meng, B.-Y., Li, Y.-Q., Kanno, A., Nishizawa, Y., Hirai, A., Shinozaki, K. & Sugiura, M. (1989). The complete sequence of the rice *Oryza sativa* chloroplast genome: intermolecular recombination between distinct tRNA genes accounts for a major plastid DNA inversion during the evolution of the cereals. *Mol. Gen. Genet.*, **217**: 185–194.
- Hirose, T., Kusumegi, T. & Sugiura, M. (1998). Translation of tobacco chloroplast *rps14* mRNA depends on a Shine-Dalgarno-like sequence in

- the 5'-untranslated region but not on internal RNA editing in the coding region. *FEBS Lett.*, **3**: 257–260.
- Hirose, T. & Sugiura, M. (1996). *Cis*-acting elements and trans-acting factors for accurate translation of chloroplast *psbA* mRNAs: development of an *in vitro* translation system from tobacco chloroplasts. *EMBO J.*, **15**: 1687–95.
- Hoffer, P. & Christopher, D. (1997). Structure and blue-light-responsive transcription of a chloroplast *psbD* promoter from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.*, **115**: 213–222.
- Hu, J. & Bogorad, L. (1990). Maize chloroplast RNA polymerase: the 180-, 120- und 38-kilodalton polypeptides are encoded in chloroplast genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**: 1531–1535.
- Hu, J., Troxler, R. & Bogorad, L. (1991). Maize chloroplast RNA polymerase: the 78-kilodalton polypeptide is encoded by the plastid *rpoC1* gene. *Nucl. Acids Res.*, **19**: 3431–3434.
- Hudson, G., Holton, T., Whitfeld, P. & Bottomley, W. (1988). Spinach chloroplast *rpoBC* genes encode three subunits of the chloroplast RNA polymerase. *J. Mol. Biol.*, **200**: 639–654.
- Humbeck, K., Kloppstech, K. & Krupinska, K. (1994). Expression of early light-inducible proteins in flag leaves of field-grown barley. *Plant Physiol.*, **105**: 1217–1222.
- Hupfer, H., Swiatek, M., Hornung, S., Herrmann, R., Maier, R., Chiu, W.-L. & Sears, B. (2000). Complete nucleotide sequence of the *Oenothera elata* plastid chromosome, representing plastome I of the five distinguishable *Oenothera* plastomes. *Mol. Gen. Genet.*, **263**: 581–585.
- Igloi, G. & Kössel, H. (1992). The transcriptional apparatus of chloroplasts. *Crit. Rev. Plant Sci.*, **10**: 525–558.
- Ikedo, T. & Gray, M. (1999). Identification and characterization of T3/T7 bacteriophage-like RNA polymerase sequences in wheat. *Plant Mol. Biol.*, **40**: 567–578.
- Iratni, R., Diederich, L., Harrak, H., Bligny, M. & Lerbs-Mache, S. (1997). Organ-specific transcription of the *rrn* operon in spinach plastids. *Genes Dev.*, **8**: 2928–2938.
- Jacquot, J., Rouhier, N. & Gelhaye, E. (2002). Redox control by dithiol-disulfide exchange in plants: I. The chloroplastic systems. *Ann. N Y*

- Acad. Sci.*, **973**: 508–519.
- Jeanmougin, F., Thompson, J., Gouy, M., Higgins, D. & Gibson, T. (1998). Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends Biochem. Sci.*, **23**: 403–405.
- Jeschke, W., Rath, N., Baumel, P., Cygan, F. & Proksch, P. (1994). Modelling the flow and partitioning of carbon and nitrogen in the holoparasite *Cuscuta reflexa* Roxb. and in its host *Lupinus albus* L.I. Methods for estimating net flows. *J. Exp. Bot.*, **45**: 680–685.
- Ju, J., Ruan, C., Fuller, C., Glazer, A. & Mathies, R. (1995). Fluorescence energy transfer dye-labeled primers for DNA sequencing and analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**: 4347–4351.
- Kapoor, S. & Sugiura, M. (1999). Identification of two essential sequence elements in the nonconsensus type II PatpB-290 plastid promoter by using plastid transcription extracts from cultured tobacco BY-2 cells. *Plant Cell*, **11**: 1799–1810.
- Kapoor, S., Suzuki, J. & Sugiura, M. (1997). Identification and functional significance of a new class of non-consensus-type plastid promoters. *Plant J.*, **11**: 327–337.
- Kapoor, S., Wakasugi, T., Deno, H. & Sugiura, M. (1994). An *atpE*-specific promoter within the coding region of the *atpB* gene in tobacco chloroplast DNA. *Curr. Genet.*, **26**: 263–268.
- Kato, T., Keneko, T., Sato, S., Nakamura, Y. & Tabata, S. (2000). Complete structure of the chloroplast genome of a legume, *Lotus japonicus*. *DNA Res.*, **7**: 323–330.
- Kestermann, M., S., N., Kloppstech, K. & Link, G. (1998). Sequence and expression characteristics of a nuclear-encoded chloroplast sigma factor from mustard (*Sinapis alba*). *Nucl. Acids Res.*, **26**: 2747–2753.
- Kim, J., Christopher, D. & Mullet, J. (1993). Direct evidence for selective modulation of *psbA*, *rpoA*, *rbcL* and 16S RNA stability during barley chloroplast development. *Plant Mol. Biol.*, **22**: 447–463.
- Kim, J., Klein, P. & Mullet, J. (1994). Synthesis and turnover of photosystem II reaction center protein D1. *J. Biol. Chem.*, **269**: 17918–17923.
- Kim, M. & Mullet, J. (1995). Identification of a sequence-specific DNA binding factor required for transcription of the barley chloroplast blue light-responsive *psbD-psbC* promoter. *Plant Cell*, **7**: 1445–1457.

- Kim, M., Thum, K., Morishige, D. & Mullet, J. (1999). Detailed architecture of the barley chloroplast *psbD-psbC* blue light-responsive promoter. *J. Biol. Chem.*, **274**: 4684–4692.
- Kirk, J. & Tilney-Bassett, R. (1967). The Plastids. Their Chemistry, Structure, Growth, and Inheritance. *W.H. Freeman and Company, London*.
- Klaff, P. & Gruissem, W. (1991). Changes in chloroplast mRNA stability during leaf development. *Plant Cell*, **3**: 517–529.
- Klein, R. & Mullet, J. (1990). Light-induced transcription of chloroplast genes. *psbA* transcription is differentially enhanced in illuminated barley. *J. Biol. Chem.*, **265**: 1895–1902.
- Knauf, U. & Hachtel, W. (2002). The genes encoding subunits of ATP synthase are conserved in the reduced plastid genome of the heterotrophic alga *Prototheca wicherhamii*. *Mol. Genet. Genomics*, **267**: 492–497.
- Kobayashi, H., Ngerprasisiri, J. & Akazawa, T. (1990). Transcription regulation and DNA methylation in plastids during transitional conversion of chloroplasts to chromoplasts. *EMBO J.*, **9**: 307–313.
- Kobayashi, Y., Dokiya, Y. & Sugita, M. (2001). Dual targeting of phage-type RNA polymerase to both mitochondria and plastids is due to alternative translation initiation in single transcripts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **289**: 1106–1113.
- Kohler, S., Delwiche, C., Denny, P., Tilney, L., Webster, P., Wilson, R., Palmer, J. & Ross, D. (1997). A plastid of probable green algal origin in Apicomplexan parasites. *Science*, **275**: 1485–1489.
- Kowallik, K., Stoebe, B., Schaffran, I., Kroth-Pancic, P. & Freier, U. (1995). The chloroplast genome of a chlorophyll *a+c*-containing alga, *Odontella sinensis*. *Plant Mol. Biol. Repr.*, **13**: 336–342.
- Krause, K. (1999). Untersuchungen zur Zusammensetzung und Funktion des plastidären Transkriptionsapparates unter besonderer Berücksichtigung des „Transkriptionsaktiven Chromosoms“. *Dissertation, Christian-Albrecht-Universität zu Kiel*.
- Krause, K., Berg, S. & Krupinska, K. (2003). Plastid transcription in the holoparasitic plant genus *Cuscuta*: parallel loss of the *rrn16* PEP-promoter and of the *rpoA* and *rpoB* genes coding for the plastid-encoded RNA polymerase. *Planta*, **216**: 815–823.

- Krause, K., Falk, J., Humbeck, K. & Krupinska, K. (1998). Responses of the transcriptional apparatus of barley chloroplasts to a prolonged dark period and subsequent reillumination. *Physiol. Plant.*, **104**: 143–152.
- Krause, K., Maier, R., Kofer, W., Krupinska, K. & Herrmann, R. (2000). Disruption of plastid-encoded RNA polymerase genes in tobacco: expression of only a distinct set of genes is not based on selective transcription of the plastid chromosome. *Mol. Gen. Genet.*, **263**: 1022–30.
- Krupinska, K. (1992). Transcriptional control of plastid gene expression during development of primary foliage leaves of barley grown under a daily light-dark-regime. *Planta*, **186**: 294–303.
- Krupinska, K. & Falk, J. (1994). Changes in RNA polymerase activity during biogenesis, maturation and senescence of barley chloroplasts. Comparative analysis of transcripts synthesized either in run-on assays or by transcriptionally active chromosomes. *J. Plant Physiol.*, **143**: 298–305.
- Kruse, O., Zheleva, D. & Barber, J. (1997). Stabilization of photosystem two dimers by phosphorylation: implication for the regulation of the turnover of D1 protein. *FEBS Lett.*, **408**: 276–280.
- Kudla, J., Igloi, G., Metzloff, M., Hagemann, R. & Kössel, H. (1992). 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**: 1099–1103.
- Kugita, M., Kaneko, A., Yamamoto, Y., Takeya, Y., Matsumoto, T. & Yoshinaga, K. (2003). The complete nucleotide sequence of the hornwort (*Anthoceros formosae*) chloroplast genome: insight into the earliest land plants. *Nucl. Acids Res.*, **31**: 716–721.
- Kuijt, J. (1969). The biology of parasitic flowering plants. *University of California Press, Berkeley USA*.
- Kuijt, J. (1991). The haustorial interface: what does it tell us? *Proceed. of the 5th International Symposium on Parasitic Weeds*: 1–5.
- Kunnimalaiyaan, M. & Nielsen, B. (1997). Fine mapping of replication origins (oriA and oriB) in *Nicotiana tabacum* chloroplast DNA. *Nucl. Acids Res.*, **25**: 3681–3686.
- Kunnimalaiyaan, M., Shi, F. & Nielsen, B. (1997). Analysis of the tobacco chloroplast DNA replication origin (oriB) downstream of the 23 S rRNA gene. *J. Mol. Biol.*, **2268**: 273–283.

- Kurth, J., Varotto, C., Pesaresi, P., Biehl, A., Richly, E., Salamini, F. & Leister, D. (2002). Gene-sequence-tag expression analyses of 1,800 genes related to chloroplast functions. *Planta*, **215**: 101–109.
- Lahiri, S. & Allison, L. (2000). Complementary expression of two plastid-localized sigma-like factors in maize. *Plant Physiol.*, **123**: 883–894.
- Legen, J., Kemp, S., Krause, K., Profanter, B., Herrmann, R. & Maier, R. (2002). Comparative analysis of plastid transcription profiles of entire plastid chromosomes from tobacco attributed to wild-type and PEP-deficient transcription machineries. *Plant J.*, **31**: 171–188.
- Lemieux, C., Otis, C. & Turmel, M. (2000). Ancestral chloroplast genome in *Mesostigma viride* reveals an early branch of green plant evolution. *Nature*, **403**: 649–652.
- Lerbs, S., Bräutigam, E. & Mache, R. (1988). DNA-dependent RNA polymerase of spinach chloroplasts: characterization of α -like and σ -like polypeptides. *Mol. Gen. Genet.*, **211**: 459–464.
- Liere, K. & Maliga, P. (1999). In vitro characterization of the tobacco *rpoB* promoter reveals a core sequence motif conserved between phage-type plastid and plant mitochondrial promoters. *EMBO J.*, **18**: 249–257.
- Liere, K. & Maliga, P. (2001). Plastid RNA polymerases in higher plants. *Regulation of photosynthesis*. In: Aro E-M, Anderson, B (eds). Kluwer, Rotterdam: 29–39.
- Lin, S., Wu, H., Jia, H., Zhang, P., Dixon, R., May, G., Gonzales, R. & Roi, B. (2001). *Medicago truncatula* Variety Jema Long A-17 Chloroplast, Complete Sequence. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, 05/2003.
- Link, G. (1984). DNA sequence requirements for the accurate transcription of a protein-coding plastid gene in a plastid *in vitro* system from mustard (*Sinapis alba* L.). *EMBO J.*, **3**: 1697.
- Lohan, A. & Wolfe, K. (1998). A subset of conserved tRNA genes in plastid DNA of nongreen plants. *Genetics*, **150**: 425–433.
- Lusson, N., Delavault, P. & Thalouarn, P. (1998). The *rbcl* gene from the non-photosynthetic parasite *Lathraea clandestina* is not transcribed by a plastid-encoded RNA polymerase. *Curr. Genet.*, **34**: 210–215.
- Machado, M. & Zetsche, K. (1990). A structural, functional and molecular analysis of plastids of the holoparasites *Cuscuta reflexa* and *Cuscuta europaea*. *Planta*, **181**: 91–96.

- Maier, R., Neckermann, K., Igloi, G. & Kössel, H. (1995). Complete sequence of the maize chloroplast genome: gene content, hotspots of divergence and fine tuning of genetic information by transcript editing. *J. Mol. Biol.*, **251**: 614–628.
- Maier, R., Zeltz, P., Kössel, H., Bonnard, G., Gualberto, J. & Grienenberger, J. (1996). RNA editing in plant mitochondria and chloroplasts. *Plant Mol. Biol.*, **32**: 343–365.
- Maliga, P. (1998). Two plastid RNA polymerases of higher plants: an evolving story. *Trends Plant Sci.*, **3**: 4–6.
- Martin, W. & Borst, P. (2003). Secondary loss of chloroplasts in trypanosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**: 765–767.
- Martin, W. & Herrmann, R. (1998). Gene transfer from organelles to the nucleus: how much, what happens and why? *Plant Physiol.*, **118**: 9–17.
- Martin, W., Rujan, T., Richly, E., Hansen, A., Cornelsen, S., Lins, T., Leister, D., Stoebe, B., Hasegawa, M. & Penny, D. (2002). Evolutionary analysis of Arabidopsis, cyanobacterial, and chloroplast genomes reveals plastid phylogeny and thousands of cyanobacterial genes in the nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**: 12246–11251.
- Masters, B., Stohl, L. & Clayton, D. (1987). Yeast mitochondrial RNA polymerase is homologous to those encoded by bacteriophages T3 and T7. *Cell*, **51**: 89–99.
- Mayfield, S., Yohn, C., Cohen, A. & Danon, A. (1995). Regulation of chloroplast gene expression. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **46**: 147–166.
- McCracken, S., Fong, N., Yankulov, K., Ballantyne, S., Pan, G., Greenblatt, J., Patterson, S., Wickens, M. & Bentley, D. (1997). The C-terminal domain of RNA polymerase II couples mRNA processing to transcription. *Nature*, **385**: 357–361.
- McFadden, G. (1999). Endosymbiosis and evolution of the plant cell. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **2**: 513–519.
- McFadden, G. (2001). Primary and secondary endosymbiosis and the origin of plastids. *J. Phycol.*, **37**: 951–959.
- Meng, B., Tanaka, M., Wakasugi, T., Ohme, M., Shinozaki, K. & Sugiura, M. (1988). 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**: 395–400.
- Meng, B., Wakasugi, T. & Sugiura, M. (1991). Two promoters within the *psbK-psbI-trnG* gene cluster in tobacco chloroplast DNA. *Curr. Genet.*, **20**: 259–264.
- Miyagi, T., Kapoor, S., Sugita, M. & Sugiura, M. (1998). Transcript analysis of the tobacco plastid operon *rps2/atpI/H/F/A* reveals the existence of a non-consensus type II (NCII) promoter upstream of the *atpI* coding sequence. *Mol. Gen. Genet.*, **257**: 299–307.
- Morden, C., Wolfe, K., DePamphilis, C. & Palmer, J. (1991). Plastid translation and transcription of genes in a non-photosynthetic plant: intact, missing and pseudo genes. *EMBO J.*, **10**: 3281–3288.
- Muhlbauer, S., Lossl, A., Tzekova, L., Zou, Z. & Koop, H. (2002). Functional analysis of plastid DNA replication origins in tobacco by targeted inactivation. *Plant J.*, **32**: 175–184.
- Muller, H. (1964). The relation of recombination to mutational advance. *Mut. Res.*, **1**: 2–9.
- Mullet, J. (1993). Dynamic regulation of chloroplast transcription. *Plant Physiol.*, **103**: 309–313.
- Mullet, J., Gamble-Klein, P. & Klein, R. (1990). Chlorophyll regulates accumulation of the plastid-encoded chlorophyll apoproteins CP43 and D1 by increasing apoprotein stability. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**: 4038–4042.
- Mullet, J. & Klein, R. (1987). Transcription and RNA stability are important determinants of higher plant chloroplast RNA levels. *EMBO J.*, **6**: 1571–1579.
- Musselmann, L. & Press, M. (1995). Introduction to parasitic plants. *Parasitic Plants; M.C. Press, J.D. Graves (eds.)*: 1–11.
- Neuhaus, H., Scholz, A. & Link, G. (1989). Structure and expression of a split chloroplast gene from mustard (*Sinapis alba*): ribosomal protein gene *rps16* reveals unusual transcriptional features and complex RNA maturation. *Curr. Genet.*, **15**: 63–70.
- Nickrent, D., Duff, R. & Konings, D. (1997). Structural analyses of plastid-derived 16S rRNAs in holoparasitic angiosperms. *Plant Mol. Biol.*, **34**: 731–743.

- Nickrent, D. & Soltis, D. (1995). A comparison of angiosperm phylogenies based upon complete *18S rDNA* and *rbcL* sequences. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, **82**: 208–234.
- Nickrent, D. & Starr, E. (1994). High rates of nucleotide substitution in nuclear small-subunit (18 S) rDNA from holoparasitic flowering plants. *J. Mol. Evol.*, **39**: 62–70.
- Oelmueller, R. (1989). Photooxidative destruction of chloroplasts and its effect on nuclear gene expression and extraplastidic enzyme levels. *Photochem. Photobiol.*, **49**: 229–239.
- Ogihara, Y., Isono, K., Kojima, T., Endo, A., Hanaoka, M., Shiina, T., Terachi, T., Utsugi, S., Murata, M., Mori, N., Takumi, S., Ikeo, K., Gojobori, T., Murai, R., Murai, K., Matsuoka, Y., Ohnishi, Y., Tajiri, H. & Tsunewaki, K. (2002). Structural features of a wheat plastome as revealed by complete sequencing of chloroplast DNA. *Mol. Genet. Genomics*, **266**: 740–746.
- Ohme, M., Kamogashira, T., Shinozaki, K. & Sugiura, M. (1985). Structure and cotranscription of tobacco chloroplast genes for *tRNAGlu(UUC)*, *tRNATyr(GUA)* and *tRNAAsp(GUC)*. *Nucl. Acids Res.*, **13**: 1047–1056.
- Ohtani, T., Uchiminya, H., Kato, A., Harada, H., Sugita, M. & Sugiura, M. (1984). Location and nucleotide sequence of a tobacco chloroplast DNA segment capable of replication in yeast. *Mol. Gen. Genet.*, **195**: 1–4.
- Orozco, E. J., Chen, L. & Eilers, R. (1990). The divergently transcribed *rbcL* and *atpB* genes of tobacco plastid DNA are separated by nineteen base pairs. *Curr. Genet.*, **17**: 65–71.
- Palmer, J. (1990). Contrasting moves and tempos of genome evolution in land plant organelles. *Trends Genet.*, **6**: 115–120.
- Palmer, J., Osorio, B. & Thompson, W. (1988). Evolutionary significance of inversions in legume chloroplast DNAs. *Curr. Genet.*, **14**: 65–74.
- Panda, M. & Choudhury, N. (1992). Effect of irradiance and nutrients on chlorophyll and carotenoid content and Hill reaction activity in *Cuscuta reflexa*. *Photosynthetica*, **26**: 585–592.
- Pfannschmidt, T. & Link, G. (1997). The A and B forms of plastid DNA-dependent RNA polymerase from mustard (*Sinapis alba* L.) transcribe the same genes in a different developmental context. *Mol. Gen. Genet.*, **257**: 35–44.

- Pfannschmidt, T., Ogrzewalla, K., Baginsky, S., Sickmann, A., Meyer, H. & Link, G. (2000). The multisubunit chloroplast RNA polymerase A from mustard (*Sinapis alba* L.). *Eur. J. Biochem.*, **267**: 253–261.
- Pfannschmidt, T., Schütze, K., Brost, M. & Oelmüller, R. (2001). A novel mechanism of nuclear photosynthesis gene regulation by redox signals from the chloroplast during photosystem stoichiometry adjustment. *J. Biol. Chem.*, **276**: 36125–36130.
- Privat, I., Hakimi, M.-A., Buhot, L., Favory, J.-J. & Lerbs-Mache, S. (2003). Characterization of *Arabidopsis* plastid sigma-like transcription factors SIG1, SIG2 and SIG3. *Plant Mol. Biol.*, **55**: 385–399.
- Rapp, J., Baumgartner, B. & Mullet, J. (1992). Quantitative analysis of transcription and RNA levels of 15 barley chloroplast genes. *J. Biol. Chem.*, **267**: 21404–21411.
- Rapp, J. & Mullet, J. (1991). Chloroplast transcription is required to express the nuclear genes *rbcS* and *cab*. Plastid copy number is regulated independently. *Plant Mol. Biol.*, **17**: 813–823.
- Reith, M. & Munholland, J. (1993). A high-resolution gene map of the chloroplast genome of the red alga *Porphyra purpurea*. *Plant Cell*, **5**: 465–475.
- Reith, M. & Munholland, J. (1995). Complete nucleotide sequence of the *Porphyra purpurea* chloroplast genome. *Plant Mol. Biol. Repr.*, **13**: 333–335.
- Richter, U., Kiessling, J., Hedtke, B., Decker, E., Reski, R., Börner, T. & Weihe, A. (2002). Two *RpoT* genes of *Physcomitrella patens* encode phage-type RNA polymerases with dual targeting to mitochondria and plastids. *Gene*, **290**: 95–105.
- Rochaix, J.-D. (1996). Post-transcriptional regulation of chloroplast gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Mol. Biol.*, **32**: 327–341.
- Rott, R., Liveanu, V., Drager, R., Stern, D. & Schuster, G. (1998). The sequence and structure of the 3'-untranslated regions of chloroplast transcripts are important determinants of mRNA accumulation and stability. *Plant Mol. Biol.*, **36**: 307–314.
- Saiki, R., Bugawan, T., Horn, G., Mullis, K. & Ehrlich, H. (1986). Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQaDNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature*: 163–166.

- Saiki, R., Gelfand, D., Stoffel, S., Higuchi, R., Horn, G., Mullis, K. & Ehrlich, H. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**: 487–492.
- Saldarriaga, J., Taylor, F., Keeling, P. & Cavalier-Smith, T. (2001). Dinoflagellate nuclear SSU rRNA phylogeny suggests multiple plastid losses and replacements. *J. Mol. Evol.*, **53**: 204–213.
- Sambrook, J., Fritsch, E. & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **12**(74): 5463–5467.
- Sato, S., Nakamura, Y., Kaneko, T., Asamizu, E. & Tabata, S. (1999). Complete structure of the chloroplast genome of *Arabidopsis thaliana*. *DNA Res.*, **6**: 283–290.
- Scheller, H., Jensen, P., Haldrup, A., Lunde, C. & Knoetzel, J. (2001). Role of subunits in eukaryotic Photosystem I. *Biochem. Biophys. Acta*, **1507**: 41–60.
- Schmitz-Linneweber, C., Maier, R., Alcaraz, J.-P., Cottet, A., Herrmann, R. & Mache, R. (2001). The plastid chromosome of spinach (*Spinacia oleracea*): complete nucleotide sequence and gene organization. *Plant Mol. Biol.*, **45**: 307–315.
- Schmitz-Linneweber, C., Regel, R., Du, T., Hupfer, H., Herrmann, R. & Maier, R. (2002). The plastid chromosome of *Atropa belladonna* and its comparison with that of *Nicotiana tabacum*: the role of RNA editing in generating divergence in the process of plant speciation. *Mol. Biol. Evol.*, **19**: 1602–1612.
- Schuster, G. & Gruissem, W. (1991). Chloroplast mRNA 3' end processing requires a nuclear encoded RNA-binding protein. *EMBO J.*, **10**: 1493–1502.
- Schuster, G., Lisitsky, I. & Klaff, P. (1999). Polyadenylation and degradation of mRNA in the chloroplast. *Plant Physiol.*, **120**: 937–944.
- Serino, G. & Maliga, P. (1998). RNA polymerase subunits encoded by the plastid *rpo* genes are not shared with the nucleus-encoded plastid enzyme. *Plant Physiol.*, **117**: 1165–1170.

- Sexton, T., Jones, J. & Mullet, J. (1990). Sequence and transcriptional analysis of the barley *psbD-psbC* promoter utilization: a novel mechanism regulating chloroplast gene expression. *Curr. Genet.*, **17**: 445–454.
- Shiina, T., Allison, L. & Maliga, P. (1998). *rbcL* transcript levels in tobacco plastids are independent of light: reduced dark transcription rate is compensated by increased mRNA stability. *Plant Cell*, **10**: 1713–1722.
- Shimada, H. & Sugiura, M. (1991). Fine structural features of the chloroplast genome: comparison of the sequenced chloroplast genomes. *Nucl. Acids Res.*, **19**: 983–995.
- Siemeister, G. & Hachtel, W. (1989). A circular 73kb DNA from the colourless flagellate *Astasia longa* that resembles the plastid DNA of *Euglena*: restriction and gene map. *Curr. Genet.*, **15**: 435–442.
- Siemenroth, A., Wollgiehn, R., Neumann, D. & Börner, T. (1981). Synthesis of ribosomal RNA in ribosome-deficient plastids of the mutant „albostrians“ of *Hordeum vulgare* L. *Planta*, **153**: 547–555.
- Silhavy, D. & Maliga, P. (1998). Mapping of promoters for the nucleus-encoded plastid RNA polymerase (NEP) in the iojap maize mutant. *Curr. Genet.*, **33**: 340–344.
- Soura, R. (1996). Structural and mechanistic relationships between nucleic acid polymerases. *Trends Biol. Sci.*, **21**: 186–190.
- Southern, E. (1975). Detection of specific sequences among DNA-fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, **98**: 503–517.
- Sriraman, P., Silhavy, D. & Maliga, P. (1998). The phage-type PclpP-53 plastid promoter comprises sequences downstream of the transcription initiation site. *Nucl. Acids Res.*, **26**: 4874–4879.
- Staub, J. & Maliga, P. (1993). Accumulation of D1 polypeptide in tobacco plastids is regulated via the untranslated region of the *psbA* mRNA. *EMBO J.*, **12**: 601–606.
- Stirdivant, S., Crossland, L. & Bogorad, L. (1985). DNA supercoiling affects transcription of two maize chloroplast genes differently. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**: 4886–4890.
- Stirewalt, V., Michalowski, C., Löffelhardt, W., Bohnert, H. & Bryant, D. (1995). Nucleotide sequence of the cyanelle genome from *Cyanophora paradoxa*. *Plant Mol. Biol. Repr.*, **13**(4): 327–332.

- Stoebe, B. & Kowallik, K. (1999). Gene-cluster analysis in chloroplast genomics. *Trends Genet.*, **15**: 344–347.
- Stoebe, B. & Maier, U.-G. (2002). One, two, three: nature's tool box for building plastids. *Protoplasma*, **219**: 123–130.
- Stoebe, B., Martin, W. & Kowallik, K. (1998). Distribution and nomenclature of protein-coding genes in 12 sequenced chloroplast genomes. *Plant Mol. Biol. Repr.*, **16**: 243–255.
- Strauss, S., Palmer, J., Howe, G. & Doerksen, A. (1988). Chloroplast genomes of two conifers lack a large inverted repeat and are extensively rearranged. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**: 3898–3902.
- Strittmatter, G., Godzicka-Josefiak, A. & Kössel, H. (1985). Identification of an rRNA operon promoter from *Zea mays* chloroplast which excludes the proximal tRNA^{Val} from the primary transcript. *EMBO J.*, **4**: 599–604.
- Suck, R. (1996). Charakterisierung des membranassoziierten Transkriptionskomplexes von Plastiden der Gerste (*Hordeum vulgare*). *Dissertation, Fachbereich Biologie der Universität Hamburg*.
- Sugita, M. & Sugiura, M. (1984). Nucleotide sequence and transcription of the gene for the 32 000 dalton thylakoid membrane protein from *Nicotiana tabacum*. *Mol. Gen. Genet.*, **195**: 308–313.
- Sugiura, M. (1992). The chloroplast genome. *Plant Mol. Biol.*, **19**: 149–168.
- Sugiura, M., Hirose, T. & Sugita, M. (1998). Evolution and mechanism of translation in chloroplasts. *Annu. Rev. Genet.*, **32**: 437–459.
- Sugiura, M., Shinozaki, K., Zaita, N., Kusuda, M. & Kumano, M. (1986). Clone bank of the tobacco (*Nicotiana tabacum*) chloroplast genome as a set of overlapping restriction endonuclease fragments: mapping of eleven ribosomal protein genes. *Plant Science*, **44**: 211–216.
- Summer, H., Pfannschmidt, T. & Link, G. (2000). Transcripts and sequence elements suggest differential promoter usage within the *ycf3-psaAB* gene cluster on mustard (*Sinapis alba* L.) chloroplast DNA. *Curr. Genet.*, **37**: 45–52.
- Sun, E., Wu, B. & Tewari, K. (1989). *In vitro* analysis of the pea chloroplast 16S rRNA gene promoter. *Mol. Cell. Biol.*, **9**: 5650–5659.
- Surpin, M., Larkin, R. & Chory, J. (2002). Signal transduction between the chloroplast and the nucleus. *Plant Cell, Supplement*: S327–S338.

- Surzycki, S. & Shellenbarger, D. (1976). Purification and characterization of a putative sigma factor from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**: 3961–3965.
- Suzuki, J., Sriraman, P., Svab, Z. & Maliga, P. (2003). Unique architecture of the plastid ribosomal RNA operon promoter recognized by the multisubunit RNA polymerase in tobacco and other higher plants. *Plant Cell*, **15**: 195–205.
- Tanaka, K., Tozawa, Y., Mochizuki, N., Shinozaki, K., Nagatani, A., Waka-sa, K. & Takahashi, H. (1997). Characterization of three cDNA species encoding plastid RNA polymerase sigma factors in *Arabidopsis thaliana*: Evidence for the sigma factor heterogeneity in higher plant plastids. *FEBS Lett.*, **413**: 309–313.
- Temiakov, D., Montesana, P., Ma, K., Mustaev, A., Borukhov, S. & McAl-lister, W. (2000). The specificity loop of T7 RNA polymerase interacts first with the promoter and then with the elongating transcript, suggesting a mechanism for promoter clearance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**: 14109–14114.
- Thalouarn, P., Arnaud, M. & Renaudin, S. (1989). Evidence for ribulose-bisphosphate in the Scrophulariaceae holoparasite *Lathraea clandestina* L. *CR Acad. Scr. Paris*, **309**: 275–280.
- Thalouarn, P., Theodet, C., Russo, N. & Delavault, P. (1994). The reduced plastid genome of a non-photosynthetic angiosperm *Orobanche hederæ* has retained the *rbcL* gene. *Plant Physiol. Biochem.*, **32**: 233–242.
- Thomson, W. & Whatley, J. (1980). Development of nongreen plastids. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **31**: 375–394.
- Thorbjornsen, T., Asp, T., Jorgensen, K. & Nielsen, T. (2001). Starch biosynthesis from triose-phosphate in transgenic potato tubers expressing plastidic fructose-1,6-bisphosphatase. *Planta*, **32**(1-2).
- Tiller, K., Eisermann, A. & Link, G. (1991). The chloroplast transcription apparatus from mustard (*Sinapis alba* L.). Evidence for three different transcription factors which resemble bacterial *sigma*-factors. *Eur. J. Biochem.*, **198**: 93–99.
- Tiller, K. & Link, G. (1993a). Phosphorylation and dephosphorylation affect functional characteristics of chloroplast and etioplast transcription systems from mustard (*Sinapis alba* L.). *EMBO J.*, **12**: 1745–1753.

- Tiller, K. & Link, G. (1993b). Sigma-like transcription factors from mustard (*Sinapis alba* L.) etioplasts are similar in size to, but functionally distinct from their chloroplast counterparts. *Plant Mol. Biol.*, **21**: 503–513.
- Tozawa, Y., Tanaka, K., Takahashi, H. & Wakasa, K. (1998). Nuclear encoding of a plastid sigma factor in rice and its tissue- and light-dependent expression. *Nucl. Acids Res.*, **26**: 415–419.
- Tsudzuki, J., Nakashima, K., Tsudzuki, T., Hirotsuka, J., Shibata, M., Waksugi, T. & Sugiura, M. (1992). Chloroplast DNA of black pine retains a residual inverted repeat lacking rRNA genes: nucleotide sequences of *trnQ*, *trnK*, *psbA*, *trnI* and *trnH* and the absence of *rps16*. *Mol. Gen. Genet.*, **232**: 206–214.
- Turmel, M., Otis, C. & Lemieux, C. (1999). The complete chloroplast DNA sequence of the green alga *Nephroselmis olivacea*: Insights into the architecture of ancestral chloroplast genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**: 10248–10253.
- Turmel, M., Otis, C. & Lemieux, C. (2002). The chloroplast and mitochondrial genome sequences of the charophyte *Chaetosphaeridium globosum*: Insights into the timing of the events that restructured organelle DNAs within the green algal lineage that led to land plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**: 11275–11280.
- van der Kooji, T., Krause, K., Dörr, I. & Krupinska, K. (2000). Molecular, functional and ultrastructural characterisation from six species of the parasitic flowering plant genus *Cuscuta*. *Planta*, **210**: 701 – 707.
- Vera, A., Hirose, T. & Sugiura, M. (1996). A ribosomal protein gene (*rpl32*) from tobacco chloroplast DNA is transcribed from alternative promoters: similarities in promoter region organization in plastid housekeeping genes. *Mol. Gen. Genet.*, **251**: 518–525.
- Vera, A., Matsubayashi, T. & Sugiura, M. (1992). Active transcription from a promoter positioned within the coding region of a divergently oriented gene: the tobacco chloroplast *rpl32* gene. *Mol. Gen. Genet.*, **233**: 151–156.
- Vera, A. & Sugiura, M. (1995). Chloroplast rRNA transcription from structurally different tandem promoters: an additional novel-type promoter. *Curr. Genet.*, **27**: 280–284.
- Vermaas, W. & Ikeuchi, M. (1991). Photosystem II. *L. Bogorad, I.K. Vasil*

- (eds.) *The Photosynthetic Apparatus: Molecular Biology and Operation*, Academic Press, San Diego, CA: 25–111.
- Wakasugi, T., Nagai, T., Kapoor, M., Sugita, M., Ito, M., Ito, S., Tsudzuki, J., Nakashima, K., Tsudzuki, J., Nakashima, K., Tsudzuki, T., Suzuki, Y., Hamada, A., Ohta, T., Inamura, A., Yoshinaga, K. & Sugiura, M. (1997). Complete nucleotide sequence of the chloroplast genome from the green alga *Chlorella vulgaris*: The existence of genes possibly involved in chloroplast division. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**: 5967–5972.
- Wakasugi, T., Nishikawa, A., Yamada, K. & Sugiura, M. (2002). Complete nucleotide sequence of the chloroplast genome from a fern, *Psilotum nudum*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, 05/2003.
- Wakasugi, T., Sugita, M., Tsudzuki, T. & Sugiura, M. (1998). Updated map of tobacco chloroplast DNA. *Plant Mol. Biol. Repr.*, **16**: 231–241.
- Wakasugi, T., Tsudzuki, J., Ito, S., Nakashima, K., Tsudzuki, T. & Sugiura, M. (1994). Loss of all *ndh* genes as determined by sequencing the entire chloroplast genome of the black pine *Pinus thunbergii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**: 9794–9798.
- Waller, R., Keeling, P., Donald, R., Striepen, B., Handman, E. & Lang-Unnasch, N. (1998). Nuclear-encoded proteins target to the plastid in *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**: 12352–12357.
- Weihe, A. & Börner, T. (1999). Transcription and the architecture of promoters in chloroplasts. *Trends Plant Sci.*, **4**: 169–170.
- Westhoff, P. & Herrmann, R. (1988). Complex RNA maturation in chloroplasts: The *psbB* operon from spinach. *Eur. J. Biochem.*, **171**: 551–564.
- Whitfeld, P. & Bottomley, W. (1993). Organisation and structure of chloroplast genes. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **34**: 279–310.
- Wilson, R., Rangachari, K., Saldanha, J., Rickman, L., Buxton, R. & Eccleston, J. (2003). Parasite plastids: maintenance and functions. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, **358**: 155–164.
- Wimpee, C., Morgan, R. & Wrobel, R. (1992). An aberrant plastid ribosomal RNA gene cluster in the root parasite *Conopholis americana*. *Plant Mol. Biol.*, **18**: 275–285.
- Wimpee, C., Wrobel, R. & Garvin, D. (1991). A divergent plastid genome in *Conopholis americana*, an achlorophyllous parasitic plant. *Plant Mol.*

- Biol.*, **17**: 161–166.
- Wolfe, K., Morden, C., Ems, S. & Palmer, J. (1992a). Rapid evolution of the plastid translational apparatus in a nonphotosynthetic plant: loss or accelerated sequence evolution of tRNA and ribosomal protein genes. *J. Mol. Evol.*, **35**: 304–317.
- Wolfe, K., Morden, C. & Palmer, J. (1992b). Function and evolution of a minimal plastid genome from a non-photosynthetic parasitic plant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**: 10648–10652.
- Wulff, E., Torres, S. & Vigil, E. (2002). Protocol for DNA extraction from potato tubers. *Plant Mol. Biol. Repr.*, **20**: 187a–187e.
- Xie, G. & Allison, L. (2002). Sequences upstream of the YRTA core region are essential for transcription of the tobacco *atpB* NEP promoter in chloroplasts in vivo. *Curr. Genet.*, **41**: 176–182.
- Yao, W., Meng, B., Tanaka, M. & Sugiura, M. (1989). An additional promoter within the protein-coding region of the *psbD-psbC* gene cluster in tobacco chloroplast DNA. *Nucl. Acids Res.*, **17**: 9583–9591.
- Yohn, C., Cohen, A., Danon, A. & Mayfield, S. (1998a). A poly(a) binding protein functions in the chloroplast as a message-specific translation factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**: 2238–2243.
- Yohn, C., Cohen, A., Rosch, C., Kuchka, M. & Mayfield, S. (1998b). Translation of the chloroplast *psbA* mRNA requires the nuclear-encoded poly (A)-binding protein RB47. *J. Cell Biol.*, **142**: 435–442.
- Yokoi, F., Vassileva, A., Hayashida, N., Torazawa, K., Wakasugi, T. & Sugiura, M. (1990). Chloroplast ribosomal protein L32 is encoded in the chloroplast genome. *FEBS Lett.*, **27**: 88–90.
- Young, D., Allen, R., Harvey, A. & Lonsdale, D. (1998). Characterization of a gene encoding a single-subunit bacteriophage-type RNA polymerase from maize which is alternatively spliced. *Mol. Gen. Genet.*, **260**: 30–37.
- Young, D., Anthony, L., Gruber, T., Arthur, T., Heyduk, E., Lu, C., Sharp, M., Heyduk, T., Burgess, R. & Gross, C. (2001). A cold-coil from the RNA polymerase beta' subunit allosterically induces selective non-template strand binding by sigma(70). *Cell*, **105**: 935–944.
- Zerges, W. (2000). Translation in chloroplasts. *Biochimie*, **82**: 583–601.

Literatur

Zhou, D., Quigley, F., Massenet, O. & Mache, R. (1989). Cotranscription of the *S10*- and *spc*-like operons in spinach chloroplasts and identification of three of their gene products. *Mol. Gen. Genet.*, **216**: 439–445.

A Anhang

A.1 pDNA-Subklone

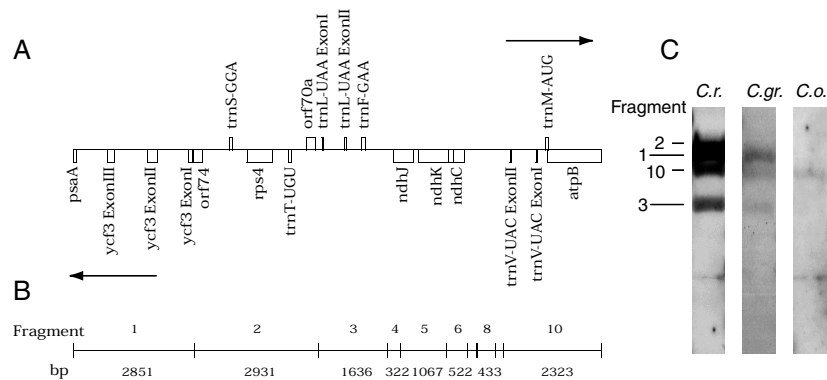


Abbildung 43 Restriktionskarte und *Southern Blot*-Analyse des pDNA-Subklons B19 aus Tabak. (A,B) Schematische Darstellung der Lage der Gene und der Lage und Größe der Restriktionsfragmente, die mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Eco*RI erhalten wurden. Die Pfeile geben die Transkriptionsrichtung an. (C) *Southern Blot*-Analyse der pDNA von *C. reflexa* (*C. r.*), *C. gronovii* (*C. gr.*) und *C. odorata* (*C. o.*). Neben den Autoradiogrammen sind die Nummern der Restriktionsfragmente angegeben.

Anhang

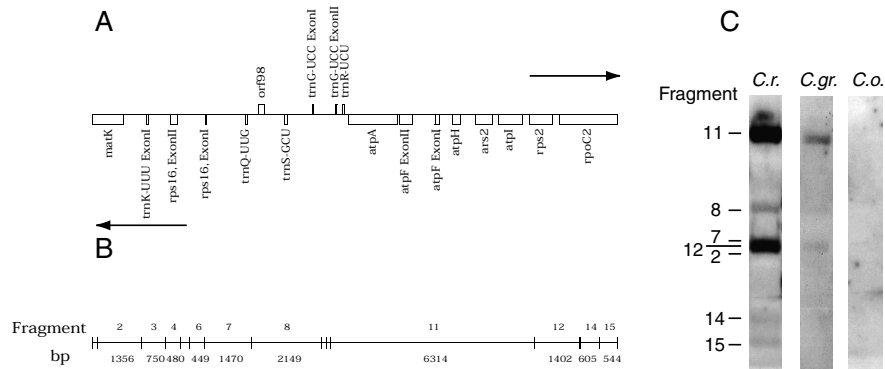


Abbildung 44 Restriktionskarte und *Southern Blot*-Analyse des pDNA-Subklons B25 aus Tabak. (A,B) Schematische Darstellung der Lage der Gene und der Lage und Größe der Restriktionsfragmente, die mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Eco*RI erhalten wurden. Die Pfeile geben die Transkriptionsrichtung an. (C) *Southern Blot*-Analyse der pDNA von *C. reflexa* (*C. r.*), *C. gronovii* (*C. gr.*) und *C. odorata* (*C. o.*). Neben den Autoradiogrammen sind die Nummern der Restriktionsfragmente angegeben.

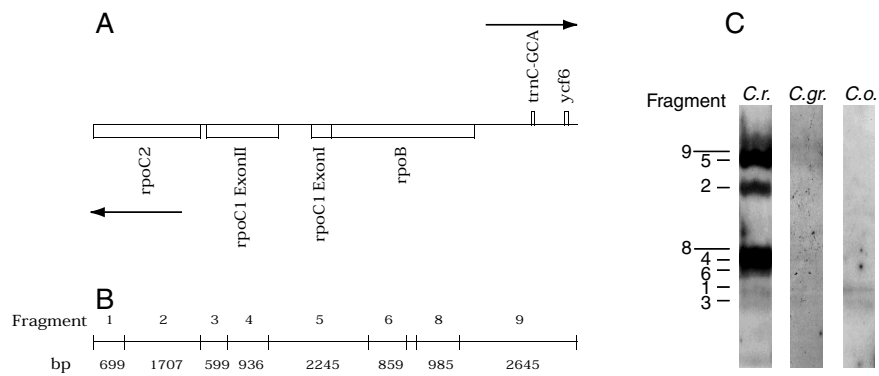


Abbildung 45 Restriktionskarte und *Southern Blot*-Analyse des pDNA-Subklons B7 aus Tabak. (A,B) Schematische Darstellung der Lage der Gene und der Lage und Größe der Restriktionsfragmente, die mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Eco*RI erhalten wurden. Die Pfeile geben die Transkriptionsrichtung an. (C) *Southern Blot*-Analyse der pDNA von *C. reflexa* (*C. r.*), *C. gronovii* (*C. gr.*) und *C. odorata* (*C. o.*). Neben den Autoradiogrammen sind die Nummern der Restriktionsfragmente angegeben.

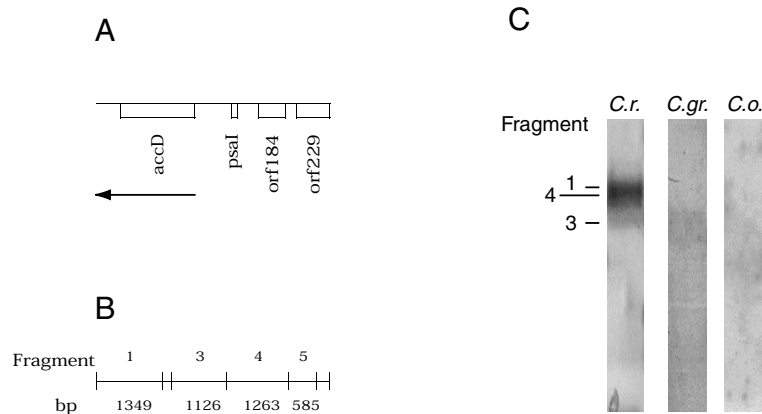


Abbildung 46 Restriktionskarte und *Southern Blot*-Analyse des pDNA-Subklons B22 aus Tabak. (A,B) Schematische Darstellung der Lage der Gene und der Lage und Größe der Restriktionsfragmente, die mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Eco*RI erhalten wurden. Die Pfeile geben die Transkriptionsrichtung an. (C) *Southern Blot*-Analyse der pDNA von *C. reflexa* (*C. r.*), *C. gronovii* (*C. gr.*) und *C. odorata* (*C. o.*). Neben den Autoradiogrammen sind die Nummern der Restriktionsfragmente angegeben.

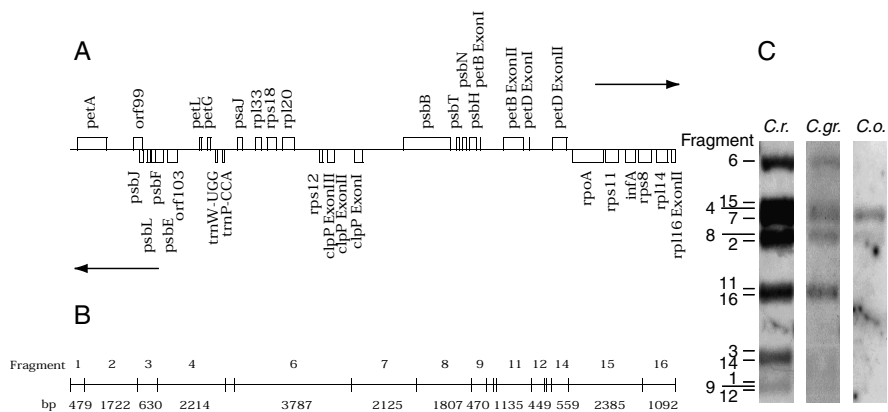


Abbildung 47 Restriktionskarte und *Southern Blot*-Analyse des pDNA-Subklons Ba1 aus Tabak. (A,B) Schematische Darstellung der Lage der Gene und der Lage und Größe der Restriktionsfragmente, die mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Eco*RI erhalten wurden. Die Pfeile geben die Transkriptionsrichtung an. (C) *Southern Blot*-Analyse der pDNA von *C. reflexa* (*C. r.*), *C. gronovii* (*C. gr.*) und *C. odorata* (*C. o.*). Neben den Autoradiogrammen sind die Nummern der Restriktionsfragmente angegeben.

Anhang

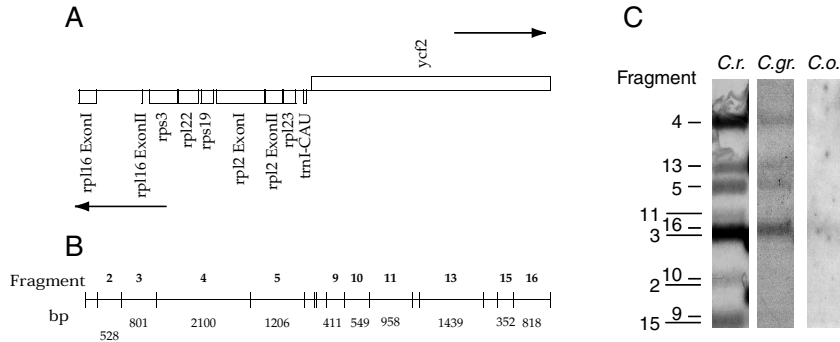


Abbildung 48 Restriktionskarte und *Southern Blot*-Analyse des pDNA-Subklons B13 aus Tabak. (A,B) Schematische Darstellung der Lage der Gene und der Lage und Größe der Restriktionsfragmente, die mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Eco*RI erhalten wurden. Die Pfeile geben die Transkriptionsrichtung an. (C) *Southern Blot*-Analyse der pDNA von *C. reflexa* (*C. r.*), *C. gronovii* (*C. gr.*) und *C. odorata* (*C. o.*). Neben den Autoradiogrammen sind die Nummern der Restriktionsfragmente angegeben.

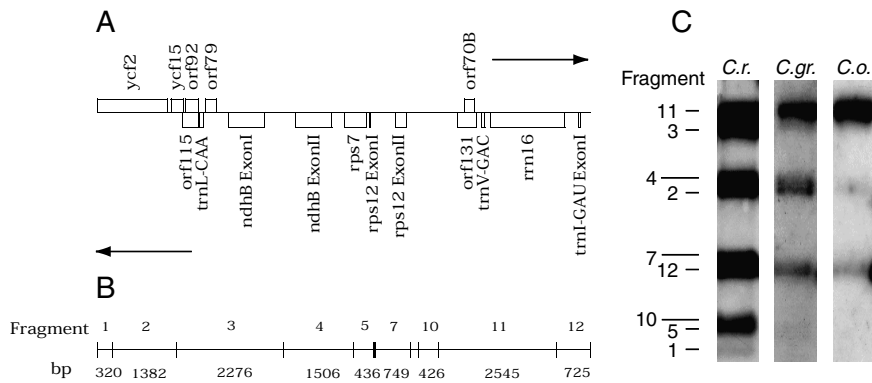


Abbildung 49 Restriktionskarte und *Southern Blot*-Analyse des pDNA-Subklons B18 aus Tabak. (A,B) Schematische Darstellung der Lage der Gene und der Lage und Größe der Restriktionsfragmente, die mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Eco*RI erhalten wurden. Die Pfeile geben die Transkriptionsrichtung an. (C) *Southern Blot*-Analyse der pDNA von *C. reflexa* (*C. r.*), *C. gronovii* (*C. gr.*) und *C. odorata* (*C. o.*). Neben den Autoradiogrammen sind die Nummern der Restriktionsfragmente angegeben.

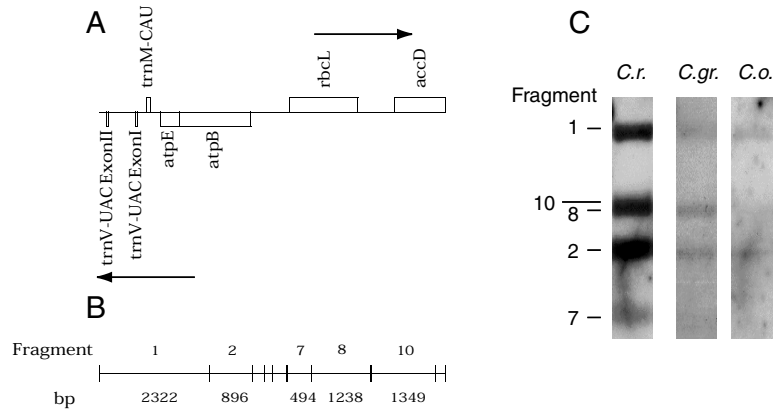


Abbildung 50 Restriktionskarte und *Southern Blot*-Analyse des pDNA-Subklons B27 aus Tabak. (A,B) Schematische Darstellung der Lage der Gene und der Lage und Größe der Restriktionsfragmente, die mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Eco*RI erhalten wurden. Die Pfeile geben die Transkriptionsrichtung an. (C) *Southern Blot*-Analyse der pDNA von *C. reflexa* (*C. r.*), *C. gronovii* (*C. gr.*) und *C. odorata* (*C. o.*). Neben den Autoradiogrammen sind die Nummern der Restriktionsfragmente angegeben.

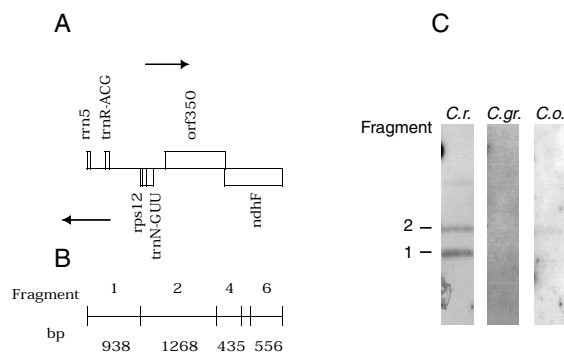


Abbildung 51 Restriktionskarte und *Southern Blot*-Analyse des amplifizierten PCR-Fragmentes aus Tabak. (A,B) Schematische Darstellung der Lage der Gene und der Lage und Größe der Restriktionsfragmente, die mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Eco*RI erhalten wurden. Die Pfeile geben die Transkriptionsrichtung an. (C) *Southern Blot*-Analyse der pDNA von *C. reflexa* (*C. r.*), *C. gronovii* (*C. gr.*) und *C. odorata* (*C. o.*). Neben den Autoradiogrammen sind die Nummern der Restriktionsfragmente angegeben.

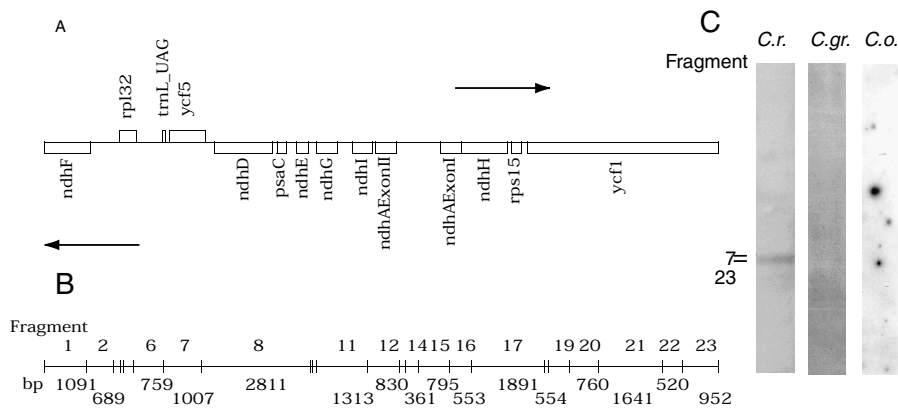


Abbildung 52 Restriktionskarte und *Southern Blot*-Analyse des pDNA-Subklons Ba2 aus Tabak. (A,B) Schematische Darstellung der Lage der Gene und der Lage und Größe der Restriktionsfragmente, die mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Eco*RI erhalten wurden. Die Pfeile geben die Transkriptionsrichtung an. (C) *Southern Blot*-Analyse der pDNA von *C. reflexa* (*C. r.*), *C. gronovii* (*C. gr.*) und *C. odorata* (*C. o.*). Neben den Autoradiogrammen sind die Nummern der Restriktionsfragmente angegeben.

A.1.1 Hypothetische Plastomkarten

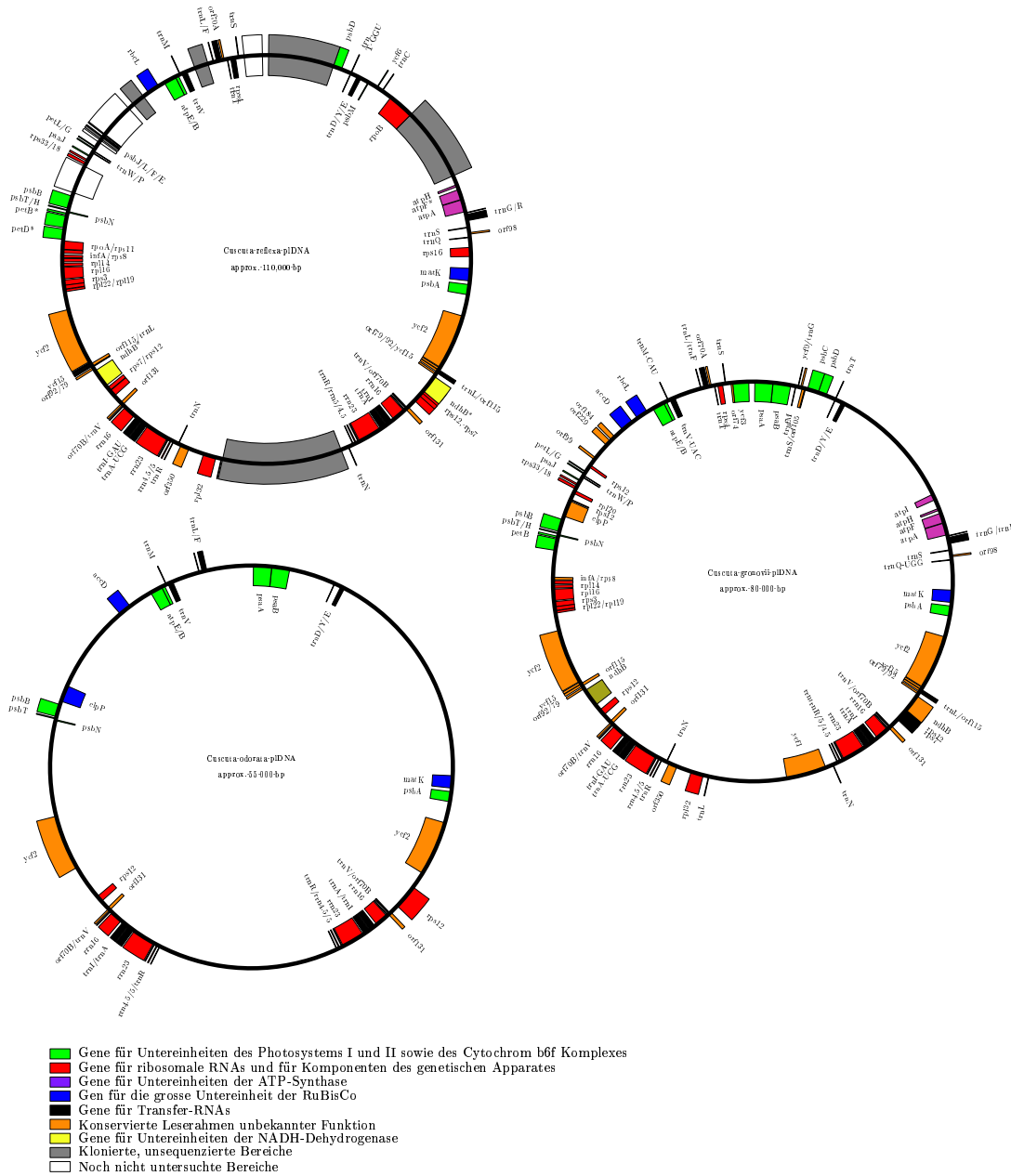


Abbildung 53 Größenvergleich der plDNA von *C. reflexa*, *C. gronovii* und *C. odorata*. Anhand der vergleichenden *Southern Blot*-Analyse der einzelnen *Cuscuta*-Arten mit der plDNA von *N. tabacum* erstellt, hypothetische Plastomkarten. Die identifizierten Gene wurden in Anlehnung an die Genabfolge auf dem Plastom von *N. tabacum* dargestellt und beziehen sich in ihrer Größe auf die Gene des Tabakplastoms.

A.2 Primer

Die verwendeten Primer sind nach der Position ihrer Sequenz auf dem Plastom von *N. tabacum* geordnet. Primersequenzen, die keine Homologien (k.H.) zur Tabakplastomsequenz haben, sind unter dem Namen des Genes, welches sie in *Cuscuta reflexa* amplifizieren, eingeordnet. Zur Sequenzierung der Plastiden-DNA von *Cuscuta reflexa* wurde auf die umfangreiche Plastomprimerbank der Arbeitsgruppe von Prof. Herrmann in München zurückgegriffen werden.

Gen	Primernamen	Position (<i>N.t.</i>)	Nukleotidsequenz (5'–3')
<i>psbA</i>	psbA-rev	551–570	gag ctt cga tag cag cta cg
	psbA-for	1482–1463	tga tcc cta cct tat tga cg
<i>matK</i>	KdomXrev	2084–2103	caa gaa agt cga agt ata ta
	MatK-for	2237–258	gaa ctg ttc ttc cga cgt taa g
	K6	2497–2477	tta ggg cat ccc att agt aaa
	MatK-rev	3360–339	tca gag gga ttt gcg ttt att g
	SmatKrev CrtrnKinfor	k.H. k.H.	gat acc gag cat aat gca t gag agg gtc tag tta att cg
<i>rps16</i>	rps16revX	5095–5114	tta gga ttg att agg acg aag
	AT7rps16	5275–5290	gta ata cga ctc act ata ggg atc gaa cat caa ttg caa cg
	rps16-for	5301–322	gat aga cgg ctc att ggg att g
	rps16infor	5600–5582	gct aaa taa atg aaa ttg c
	rps16-rev	6101–122	ctt ggc tcg aca tca ttg gtt c
	Hrps16for	6190–6175	cga tgt ggt aga aag c
	Srps16rev	6175–6191	gct ttc tac cac atc g
<i>trnQ</i> (UUG)	AT7trnQ-uug	7319–7343	gta ata cga ctc act ata ggg atc aga aac aac aat cac att c
	alf9	7447–7464	cgg gac caa aac ccg ttg
	alf8	7464–7447	caa cgg gtt ttg gtc ccg
	alf8	7464–7447	caa cgg gtt ttg gtc ccg
	AtrnQ-uug	7593–7574	tcg caa aat cct agt cca at
<i>psbK</i>	HpsbKrev	7910–7927	agc ata ggc ctc ggg caa
<i>psbI</i>	AT7psbI	8399–8419	gta ata cga ctc act ata ggg ttc ttc acg tcc agg att acg
<i>trnS</i> (GCU)	psbIMrev	8482–8501	gga cgt aat cct gga cgt ga
	AT7trnS-gcu	8614–8634	gta ata cga ctc act ata ggg aaa aaa tca agt cat caa cgg
	HtrnS(GCU)rev AtrnS-gcu	8700–8719 8721–8703	gtc cac tca gcc atc tct cc atg gga gag atg gct gag tg

Anhang

Gen	Primername	Position (<i>N.t.</i>)	Nukleotidsequenz (5'-3')
<i>trnG</i> (UCC)	AT7trnG-ucc	9491–9512	gta ata cga ctc act ata ggg att gta gcg ggt ata gtt ta
	trnGUCCfor AT7trngUCC	9500–519 9491–9512	cgg gta tag ttt agt ggt aa gta ata cga ctc act ata ggg att gta gcg ggt ata gtt ta
<i>atpA</i>	ATPHF8	10793–10774	aca ggt aag gaa att tct tg
<i>rpoC1</i>	rpoC100rev	22694–22715	gaa tga tcg gtc tca act cag g
	rpoC	23142–23164	tcg gac gtg aaa gtt tcc ttt ca
	rpoCb2	23718–23737	ttc tga gct tca tgt tac tc
	rpoC1 exon	23913–23893	acg tct tcc tag yta yat hgc
	rpo C1	24073–24055	gaa ttt gtg ctt ctg gaa a
	rpoCb3	24217–24235	tgt tga gga gaa act gat c
<i>rpoB</i>	rpoB p1 rev	25015–24993	att ttg cct agr caa gat atg cc
	rpoB p2 rev	25546–25525	tta gtr gct tat atg ccn tgg g
	rpoCb6	25998–26016	aat tct tga cgg tat cga g
	rpoB p3 rev	26233–26212	tcy gaa gga atc aat gtt gga c
	rpoB-left-rev	26376–396	agg aaa cag cta tga cca aaa ctt gag ata atg gg
	rpoB-left	26376–396	tcc aaa act tga gat aat ggg
	rpoBCus1	26477–497	gac gta ttg ctc cac ata gag
	rpoBCus2	27346–327	cat atc caa ttg gta gaa cc
	rpoB-for-for	27449–430	gta aaa cga cgg cca gta gga ttt tgt agg ttc att g
	rpoB-for	27449–430	agg att ttg tag gtt cat tg
<i>trnC</i> (GCA)	AtrnC-gca	28780–28800	ttt gta gca ttt tgg cga ca
	trnC-GCArevX	28864–28844	agg cga cac ccg gat ttg aac
<i>psbD</i>	psbd-for	34564–34583	gtc ggt ccg gtc tat tgc tc
	5'psbDrev	34724–34704	act att agc agg agt aga aac
	ApsbD	35050–35069	tga acc cat ttc ata tga tg
	psbd-rev AT7psbD	35457–35438 35511–35492	tcc aag cgc gaa tac ctt cg gta ata cga ctc act ata ggg tag aac ctc ctc agg gga at
<i>psbC</i>	ApsbC	35671–35691	gga gca atg aac cta ttt ga
<i>trnS</i> (GGA)	AtrnS-gga	47142–47161	ggc gta gca ttg gaa ctg ct
<i>rps4</i>	AT7rps4	47561–47574	gta ata cga ctc act ata ggg ata
	Hrps4revNEW	47868–47885	ata ttc tac gac tag caa ttc cca aac gca ttt caa gta

Anhang

Gen	Primername	Position (<i>N.t.</i>)	Nukleotidsequenz (5'-3')
	rps4 zurueck Arps4	47962-47984 48125-48104	aag acc ata atg aaa acg caa ct gac ctc gtt tca aaa aaa tac
<i>trnT</i> (UGU)	HtrnTUGUr	48515-48534	ccg gct atc gga atg gaa cc
<i>ORF70a</i>	AT7orf70a	49161-49141	gta ata cga ctc act ata ggg act atc ttc tat agg aga cct
<i>trnL</i> (UAA)	HtrnLx1rev	49391-49372	ggt ttc tct gaa ttc gaa ag
<i>trnV</i> (UAC)	AtrnV-uac	54404-54384	gca cta agg gct ata gct ca
<i>atpE</i>	AT7atpE	55002-55022	gat aat acg act cac tat agg gtt tgc tga gct tct tgt gga t
	atpE.P2 Stop atpB AatpE	55024-55005 55268-55250 55282-55261	tga tcc aca aga agc tca gc gtg tac tga ccc cta atc g gac ctt aaa tct tag tgt act
<i>atpB</i>	atpB.P2 atpB.P3	56048-025 56025-048	ggagctcgtatgagagttgg ccaactctcatacgagctcc
<i>rbcL</i>	atpB.P4-uni	56747-765	gta aaa cga cgg cca gta gaa cca gaa gta gta gg
	atpB.P5-uni	56495-012	tgt aaa acg acg gcc agt ctg tgt caa tca ctt cc
	atpB.P3-uni	56025-048	gta aaa cga cgg cca gtc aac tct cat acg agc tc
	atpB.P6-rev rbcL.ATG-IRD	56051-034 57624-595	tcc ggt act aga tgt ag act tgc ttt agt ctc tgt ttg tgg tga cat
	rbcL.P1-rev	57654-636	agg aaa cag cta tga ccg tac tct tta aca cca gc
	rbcL.P5-rev	57735-754	agg aaa cag cta tga ccg ctt ctt cag gtg gaa ct
	rbcL-for rbcL-for-uni	57610-629	gag act aaa gca agt gtt gg gta aaa cga cgg cca gta gac taa agc aag tgt tg
	rbcL.P2 rbcL.P2-rev	58342-328 58342-328	gat cat ttc ttc gca tgt acc cag gaa aca gct atg acc att tct tcg cat gta cc
	rbcL.P3-uni	58328-342	gta aaa cga cgg cca gta cat gcg aag aaa tg
	rbcL-rev	59024-003	cat ttg gat cca agg tat cca

Anhang

Gen	Primername	Position (<i>N.t.</i>)	Nukleotidsequenz (5'-3')
	rbcLrev-rev	59024-003	agg aaa cag cta tga cca ttt gga tcc aag gta tc
	rbcL.P4-rev	59056-039	cag gaa aca gct atg act ttc tcc tta tcc ttc
<i>accD</i>	accD-for accD-rev	59903-923 60701-683	gct aaa taa atc aat ggg cag aat ggg atc tag aga gac c
<i>trnQ</i> (UGG)	trnQ-UGGrevM	59853-59834	ttg cct tac cac ttg gcc ac
<i>petL</i>	ApetL	68325-68345	tta gcg gct tta act ata ac
<i>petG</i>	ApetG petGfor AT7petG	68571-68592 68630-68650 68692-68672	gat tga agt ttt tct att tg tta ttc gta act gca tat tta gat aat acg act cac tat agg gtt aat taa tca aag gtc caa
<i>psaJ</i>	psaJcrev	69614-69894	agc gta ctt agt act ggt gcc
<i>rps18</i>	rps18-for Arps18 rps18-rev	70538-557 70591-70611 70802-784	ttt tct taa att caa gcg at ggg atc gaa ttg att ata ga acc agt agt tct agc ggt c
<i>rpl20</i>	rpl20-for rpl20-rev	71054-075 71398-377	tac ttc ctt tat gat ttc gtt c ata tat agc tcg gag acg tag a
<i>psbB</i>	psbBR4	75712-75730	gga act atg tgg tat ggt t
<i>psbH</i>	psbHrev psbH3'for	77309-77290 77269-77291	att cca tcc aat aaa acg ga att ttg gag att tat aat tct tc
<i>petB</i> <i>petB</i>	psBHR psbHF2 petBex2rev petB-Sallrev	77471-77451 77874-77894 78232-78211 78852-78833	ata aca agt cac aca ctc ata ctt aac aag aga att cct atc ctt cga acc aat cat aga ctt t ttt ttc gtc gac cta taa agg ccc aga aat ac
<i>petD</i>	rpoA-left petD5 petD5-IRD petD5-uni	79305-327 79026-049 79026-049 79026-049	agt atg taa atg tat tca ttt cc cga aat gaa aat gga tta tgg gag cga aat gaa aat gga tta tgg gag tgt aaa acg acg gcc agt aaa atg gat tat ggg ag tgt aaa acg acg gcc agt atg taa atg tat tca ttt cc
	rpoA-left-uni	79305-327	
<i>rpoA</i>	rpoACus1	79711-729	gct tct tgc tcg agc tgg atg

Anhang

Gen	Primername	Position (<i>N.t.</i>)	Nukleotidsequenz (5'-3')
	rpoACus2	k.H.	gac agc aca gaa cat ata gc
	rpoACus3	k.H.	cat agc aat gct agg tat gg
	rpoACus4	k.H.	ggt cct ggg tat gta act gc
	rpoACus5	k.H.	ggt gaa tca agt gcg aaa tg
	rpoACus6	k.H.	aca caa tgg ctg tag acc tcc
	rpoACus7	k.H.	gcc taa tat ctg ttt gac atc
	petD	80246-223	gga ttt atc aat agg taa tgt tgc
	rpoA-for	80495-514	tct aaa atg ccc aat atc cg
	rpoACus8	81466-449	ggt tcg aga gaa agt aac cg
<i>rps11</i>	AT7rps11	81542-81562	gat aat acg act cac tat agg gtc
	AT7rps11	81542-81562	ttt ttt tcg gag gtc tac
	rpoAri-IRD	81592-574	gat aat acg act cac tat agg gtc
	rpoA-right	81592-574	ttt ttt tcg gag gtc tac
	rpoAri-rev	81592-574	ggg atg taa ctc cta tgc c
	Arps11	81937-81916	ggg atg taa ctc cta tgc c
	Arps11	81937-81916	cag gaa aca gct atg acc gat gta
	Arps11	81937-81916	act cct atg cc
	Arps11	81937-81916	tac cga aaa tta gtt cgc gt
<i>rpl36</i>	AT7rpl36	82041-82061	gat aat acg act cac tat agg gca
	AT7rpl36	82041-82061	agt ctg att atc cct gt
<i>rpl14</i>	rpl14-for	83176-197	tata ata cct cgg gag cta atg
	AT7rpl14	83188-83209	gat aat acg act cac tat agg gag
	rpl14-rev	83526-505	cta atg aaa cta ttt tag
	Arpl14	83545-83525	att taa atg tag cgg ata aca g
	Arpl14	83545-83525	tga ttc aac ctc aga ccc at
<i>rpl16</i>	rpl16-for	84035-056	tct atg ttg ttt acg gaa tct g
	Arpl16	84059-84039	gaa cca gat tcc gta aac aac
	rpl16inrev	84576-84596	gtt ccg tcg ttc cca tcg ctt
	rpl16-rev	85001-980	acc cat cac ttc gca tta tct g
	RPL16for	85079-85095	gaa gtc aca cac taa gca t
<i>rps3</i>	rps3-rev	85283-303	ctc cat aga tag ttc gaa ctg
	Arps3	85895-85873	gga caa aaa ata aat cca ctt g
	rps3-for	85940-921	tac agc tat gcc gta tcg tg
<i>rpl22</i>	Arpl22	86297-86276	gtc tgc tga caa agc acg aa
	AT7rpl22	86026-86046	gat aat acg act cac tat agg gat
	AT7rpl22	86026-86046	gac agg tcg atc ttt tta t
<i>rpl23</i>	rpl23-rev	88213-232	ttt gta taa atg tat cgc cat
	rpl23-for	88590-573	ata tga aca gta aga act

Anhang

Gen	Primername	Position (N.t.)	Nukleotidsequenz (5'-3')
<i>ycf2</i>	AT7ycf2.3'	95555-95539	gat aat acg act cac tat agg gct aag cca tct ctg acg
<i>ycf15</i>	ycf15M ycf15OPII ycf15for2 AT7ycf15	k.H. k.H. 95900-95919 96060-96040	gac gcc tgt tgg cat tcc ag tgt tcc gtg gag cta agg tc tct tag atc aaa aca cta tg gta ata cga ctc act ata ggg ata gac gcc tgt tgg cat tcc
<i>trnL</i> (CAA)	AT7trnL-caa	96425-96445	gat aat acg act cac tat agg gta tta tgc ctt gaa gag gac t
ORF 79	Aorf79	96555-96576	gtg atg tat gga ata tat ga
<i>trnL</i> (CAA)	AtrnL-caa	96576-96485	tgg tga tga aat ggt aga cac gcg
<i>rps7</i>	rps7-rev rps7-for	99557-574 100007-99988	aag ctc gat ttg cct ctg atg tca cgt cga ggt act gc
<i>trnG</i> (UCC)	trnGUCCrev AtrnG-ucc	10249-10231 10430-10450	gga atc gaa ccc gca tcg t cga ata gct ttg tag atg atc
<i>trnA</i> (UGC)	AtrnA-ugc AT7trnA-ugc	105395-105415 106164-106144	ggg ata tag ctc agt tgg ta gat aat acg act cac tat agg gac tcg aac cgc tga cat cc
<i>rrn23</i>	trnA exon1, I Arrn23 AT7rrn23 rrn23forM 23SrDNA I	105403-105420 106408-106428 106955-106935 107587- 107607/135019- 135039 107673- 107690/134953- 134936	gct cag ttg gta gag ctc ggg agt tga aaa taa gca ta gat aat acg act cac tat agg gtt ccc tta acc aag cca c cga agc gga agc gag aat gtc gtt cgt cca cgg agg gtg
<i>rrn4.5</i>	S.rrn4.5 Arrn4.5	109321-109302 109408-109428	agg atg cct cag ctg cat ac gag ccg ttt atc att acg at
<i>rrn5</i>	Arrn5	109594-109614	ttc gat att ctg gtg tcc ta
IR	rrn5.1	109654-674	tta aac tct act gcg gtg acg

Anhang

Gen	Primername	Position (<i>N.t.</i>)	Nukleotidsequenz (5'-3')
	AT7rrn5	109716–109695	gat aat acg act cac tat agg gct ggc gtc gag cta ttt ttc c
<i>ycf1</i>	rrn5.2	109598–617	ata ttc tgg tgt cct agg cg
	<i>ycf1Cus1</i>	k.H.	ggt tga cag aag gta ttc
	<i>ycf1Cus2</i>	k.H.	caa att cct gaa tgg tct gaa g
<i>ycf5</i>	<i>ycf5Cus1</i>	116365–46	gct cta agg ttg aaa cta tc
	<i>ycf5Cus2</i>	k.H.	cta tcg aaa ggg aaa tat gag

Eigene Veröffentlichungen

Begutachtete Veröffentlichungen

Krause, K., **Berg, S.**, Krupinska, K. (2003). Plastid transcription in the holoparasitic plant genus *Cuscuta*: parallel loss of the *rrn16* PEP-promoter and of the *rpoA* and *rpoB* genes coding for the plastid-encoded RNA polymerase, *Planta*, pp. 815–823, Vol. 216

Berg, S., Krupinska, K., Krause, K. (2003). Plastids of three *Cuscuta* species differing in plastid coding capacity have a common parasite-specific RNA composition, zur Veröffentlichung akzeptiert bei *Planta*.

Berg, S., Krause, K., Krupinska, K. (2003). NEP-mediated transcription of a photosynthesis gene in intermediate species of *Cuscuta*, Manuskript in Vorbereitung.

Beiträge in Mitteilungsbänden von Tagungen

Berg, S., Krause, K., Kemp, S., Maier, R.M., Herrmann, R.G., Krupinska, K. (2002). Plastid genome organisation, coding capacity and transcription in the parasitic flowering plant genus *Cuscuta*. In: *Abstractband der Jahrestagung der Deutschen Botanischen Gesellschaft*, Botanikertagung, Freiburg

Berg, S., Krupinska, K. (2002): Plastid genome organization and coding potential of the holoparasitic flowering plant genus *Cuscuta*. In: *Comp. Biochem. and Physiol. 132/A, Suppl.1*, Annual Meeting of the Society of Experimental Biology, Swansea, Wales

Berg, S., van der Kooij, T.A.W., Krause, K., Krupinska, K. (2001): Analysis of the transcriptional apparatus in the holoparasitic flowering plant genus *Cuscuta*. In: *Tagungsband der „9th International Conference on intelligent systems for molecular biology“*, Kopenhagen, Dänemark

Berg, S., van der Kooij, T.A.W., Krause, K., Krupinska, K. (2001): Analysis of the transcriptional apparatus in the holoparasitic flowering plant genus *Cuscuta*. In: *Proceedings of the 7th International Parasitic Weed Symposium*, 7th International Parasitic Weed Symposium, Nantes, Frankreich

Krause, K., Van der Kooij, T.A.W., **Berg, S.**, Dörr, I., Krupinska, K.: Correlation between plastome reduction and functional and ultrastructural aspects of plastid from species within the flowering plant genus *Cuscuta*. In: *Eur. J. Biochem.* 79, Suppl. 50, 66 (2000), Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Zellbiologie, Karlsruhe

Danksagung

Prof. Dr. K. Krupinska danke ich für die Betreuung und die Möglichkeit zur Anfertigung dieser Arbeit in ihrer Arbeitsgruppe, ihre wertvollen fachlichen Ratschläge und stete Diskussionsbereitschaft, die maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beitrugen. Vielen Dank dafür!

Dr. Kirsten Krause hat unermüdlich und engagiert fachliche Ratschläge gegeben, sich auf umfangreiche Diskussionen eingelassen und das Manuskript dieser Arbeit sorgfältig und kritisch gelesen. Meinen besonderen Dank dafür!

Dr. Jon Falk sei gedankt für seine ständige Diskussionsbereitschaft, seine positive Einstellung und die ständige Besorgnis um meine körperliche Fitness. Vielen Dank für die ausgedehnten Waldläufe und „Wettkämpfe“!

Die Friedrich-Naumann-Stiftung förderte diese Arbeit durch ein Graduiertenstipendium, welches mehr als „nur“ eine finanzielle Unterstützung bedeutete. Besonders Frau Wohlleben und Frau Simon von der Begabtenförderung sei an dieser Stelle gedankt für ihre umfassende Betreuung in allen Stiftungsangelegenheiten.

Bei PD Dr. R. Maier und allen Mitgliedern seiner Arbeitsgruppe möchte ich mich für die freundliche Aufnahme in München und die fachliche Unterstützung für das Vorankommen meiner Arbeit herzlich bedanken.

Dr. H. Ougham, Dr. H. Thomas und alle Mitglieder der *Cell Biology Group* ermöglichten mir einen spannenden und lehrreichen Aufenthalt am IGER in Aberystwyth. Thank you and *Diolch yn fawr*.

Allen jetzigen und ehemaligen Mitgliedern der AG Krupinska sei Dank für die schöne gemeinsame Zeit im Labor, für die vielen „Sprüche, die die Welt nicht braucht“ und unterhaltsamen Konversationen!

Vielen Dank an Herrn Maasen und Herrn Haack, die sich um das leibliche Wohl der *Cuscuta*-Pflanzen kümmerten.

Allen lieben Freunden und fleißigen Korrekturleserinnen und Korrekturlesern: Alex, Anja, Astrid, Bernd, Hanno, Maike, Silke und Ulrike, Euch sage ich vielen, vielen Dank für die Hilfe und Unterstützung. Auch Herrn Dr. Pütz sei gedankt für das genaue Korrekturlesen des Manuskripts.

Dir, mein lieber Torsten, danke ich von ganzem Herzen für Deine stetige Unterstützung, Geduld und Aufmunterungen.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern. Sie haben mich stets in meinen Entscheidungen auch in schwierigen Zeiten unterstützt und mir die Freiheit gelassen, meinen eigenen Weg zu gehen.

Lebenslauf

Sabine Berg

Persönliche Daten

Geburtsdatum	8.12.1970
Geburtsort	Frankfurt am Main
Staatsangehörigkeit	deutsch

Ausbildung

01/2000–05/2003	Promotion im Fach <i>Botanik</i> ; Universität Kiel; Universität München; IGER, Aberystwyth
01–09/2000	Forschungsaufenthalt im Rahmen der Promotion bei Dr. H. Ougham am <i>Institute of Grassland and Environmental Research (IGER)</i> , Aberystwyth, Wales
01/1998–02/1999	Diplomarbeit am Biochemischen Institut der Univer- sität Kiel; Arbeitsgruppe Prof. Dr. V. Gieselmann
10/1993–01/1998	Biologie (Diplom), Universität Kiel Hauptfach: Botanik; Nebenfächer: Biochemie, Mikrobiologie, Zoologie
09/1992–06/1993	Austauschstudium, University of Stirling
04/1991–07/1996	Biologie/Englisch, Lehramt Sekundarstufe II, Universität Kiel
09/1990–04/1991	Sprachaufenthalt Lincoln, England
1977–1990	Grundschule (Telgte), Gymnasium (Warendorf), Abschluß: Abitur

Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß die vorliegende Arbeit - abgesehen von der Beratung durch meine akademischen Lehrer - nach Inhalt und Form meine eigene Arbeit ist. Die Arbeit wurde bis jetzt weder ganz noch teilweise einer anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt. Ferner erkläre ich, daß ich noch keine früheren Promotionsversuche unternommen habe.

Die wörtlich oder inhaltlich anderen Quellen entnommenen Stellen sind als solche kenntlich gemacht und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet worden.

Teile der Arbeit sind in folgenden Publikationen enthalten:

1. Krause, K., Berg, S., Krupinska, K. (2003). Plastid transcription in the holoparasitic plant genus *Cuscuta*: parallel loss of the *rrn16* PEP-promoter and of the *rpoA* and *rpoB* genes coding for the plastid-encoded RNA polymerase. *Planta*, pp. 815–823, Vol. 216.
2. Berg, S., Krupinska, K., Krause, K. (2003). Plastids of three *Cuscuta* species differing in plastid coding capacity have a common parasite-specific RNA composition. Zur Veröffentlichung akzeptiert bei *Planta*.
3. Berg, S., Krause, K., Krupinska, K. (2003). NEP-mediated transcription of a photosynthesis gene in intermediate species of *Cuscuta*. Manuskript in Vorbereitung.

Für die mündliche Prüfung wird die Form der Disputation gewählt. Der Zulassung von Zuhörern/Zuhörerinnen bei der mündlichen Prüfung wird nicht widersprochen.

Kiel, den

Sabine Berg