

Untersuchungen zum Transkriptionsapparat von  
Plastiden verschiedener Pflanzen unter besonderer  
Berücksichtigung der Funktion des mit dem  
eukaryotischen Transkriptionsfaktor TFIIS verwandten  
ETCHED1-Proteins

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

vorgelegt von

Lenard Müller

aus Hannover

Kiel, Dezember 2004

Referentin: Prof. Dr. Karin Krupinska

Koreferent: Prof. Dr. Frank Kempken

Tag der mündlichen Prüfung: 04.02.2005

Zum Druck genehmigt:

Kiel, den

---

Der Dekan

# Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis . . . . .	VI
Tabellenverzeichnis . . . . .	VII
Abkürzungsverzeichnis . . . . .	VIII
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Evolution der Plastiden . . . . .	1
1.2 Das plastidäre Genom . . . . .	2
1.3 RNA-Polymerasen . . . . .	3
1.4 Plastidäre RNA-Polymerasen . . . . .	4
1.4.1 Die plastidär kodierte RNA-Polymerase . . . . .	5
1.4.2 Kernkodierte RNA-Polymerasen . . . . .	6
1.5 Plastidäre Promotoren und Spezifität von NEP und PEP . . . . .	8
1.6 Der plastidäre Transkriptionsapparat . . . . .	9
1.6.1 Das 'Transkriptionsaktive Chromosom' . . . . .	10
1.6.2 Die lösliche RNAP . . . . .	10
1.7 Zielsetzung dieser Arbeit . . . . .	12
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>13</b>
2.1 Chemikalien und Enzyme . . . . .	13
2.2 Anzucht von Bakterien und Plasmidisolierung . . . . .	13
2.3 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen und Isolierung von DNA-Fragmenten . . . . .	13
2.4 Gensonden . . . . .	14
2.5 <i>In vitro</i> -Transkription und -Translation von Plasmid-DNA . . . . .	15
2.6 Pflanzenmaterial . . . . .	15
2.7 Plastidenisolierung . . . . .	15
2.7.1 Isolierung von Chloroplasten aus Gerste und Mais . . . . .	15
2.7.2 Isolierung von Chloroplasten über Percoll-Stufengradienten . . . . .	16
2.7.3 Isolierung von Plastidenmembranen aus Spinatblättern . . . . .	18
2.7.4 Isolierung von plastidärer DNA . . . . .	19
2.7.5 Isolierung von Gesamtproteinextrakten aus Chloroplasten . . . . .	19

---

2.8	Isolierung von 'Transkriptionsaktiven Chromosomen' . . . . .	20
2.8.1	Solubilisierung der Membranproteine . . . . .	20
2.8.2	Protaminsulfatfällung . . . . .	20
2.8.3	Gelfiltrationschromatographie . . . . .	21
2.8.4	Abtrennung von Detergenzien . . . . .	21
2.9	Isolierung von löslichen RNA-Polymerase-Fraktionen . . . . .	22
2.10	Isolierung von DNA aus Pflanzenmaterial . . . . .	23
2.11	Isolierung von RNA aus Pflanzenmaterial . . . . .	24
2.12	Gelelektrophorese von Nukleinsäuren . . . . .	24
2.12.1	Fällung von Nukleinsäuren . . . . .	24
2.12.2	Agarose-Gelelektrophorese von DNA und RNA . . . . .	25
2.12.3	Harnstoffgelelektrophorese von RNA-Abspaltungsprodukten . . . . .	25
2.13	Immobilisierung von Nukleinsäuren auf Nylonmembranen . . . . .	26
2.14	Herstellung von DNA-'Dot-Blot'-Filtern . . . . .	26
2.15	Hybridisierung von immobilisierten Nukleinsäuren mit spezifischen Gensonden . . . . .	26
2.15.1	Herstellung radioaktiv markierter DNA-Sonden . . . . .	26
2.15.2	Isolierung von RNA-Transkripten für die Hybridisierung mit DNA auf 'Dot-Blot'-Membranen . . . . .	27
2.15.3	Hybridisierung von DNA-Membranen . . . . .	27
2.15.4	Hybridisierung von RNA-Membranen . . . . .	28
2.15.5	Detektion von Hybridisierungssignalen . . . . .	28
2.15.6	Mehrfachverwendung von Membranen . . . . .	29
2.16	Analyse von Proteinproben . . . . .	29
2.16.1	Bestimmung der Proteinkonzentration . . . . .	29
2.16.2	TCA-Fällung von Proteinen . . . . .	29
2.16.3	Phenolextraktion von Proteinen . . . . .	30
2.16.4	Chloroform / Methanol - Extraktion von Proteinen . . . . .	30
2.17	Gelelektrophorese von Proteinen . . . . .	31
2.17.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach LAEMMLI (1970) . . . . .	31
2.17.2	'High-Tris'-Gelelektrophorese nach FLING und GREGERSON (1986) . . . . .	31
2.17.3	Zweidimensionale Gelelektrophorese . . . . .	32

---

2.17.4	Molekulargewichtsmarker für die Proteingelektrophorese . . . . .	32
2.18	Detektion von geelektrophoretisch aufgetrennten Proteinen . . . . .	33
2.18.1	Coomassie-Färbung . . . . .	33
2.18.2	Silberfärbung . . . . .	33
2.18.3	Trocknung und Autoradiographie von Proteingelen . . . . .	34
2.19	Transfer von Proteinen auf Membranen . . . . .	34
2.19.1	'Western-Blot' . . . . .	34
2.19.2	Differentieller Membrantransfer . . . . .	35
2.20	Immunologische Nachweismethoden . . . . .	35
2.20.1	Antiseren . . . . .	35
2.20.2	'ECL'-Nachweis von Proteinen auf Membranen . . . . .	37
2.20.3	Mehrfachverwendung von 'Western-Blot'-Membranen . . . . .	37
2.20.4	Immunpräzipitation von Proteinen mit spezifischen Antikörpern . .	38
2.21	Transkriptionsaktivität plastidärer RNA-Polymerasen . . . . .	39
2.21.1	Bestimmung der Aktivität der TAC-RNAP . . . . .	39
2.21.2	Bestimmung der Aktivität der sRNAP . . . . .	40
2.21.3	Transkriptionsanalysen in Gegenwart von Antikörpern . . . . .	40
2.21.4	Transkriptionsanalysen in Gegenwart von Hemmstoffen . . . . .	40
2.21.5	Transkriptionsanalysen in Gegenwart von Cordycepin . . . . .	41
2.22	Photoaffinitätsmarkierung von RNAP-Untereinheiten . . . . .	41
2.22.1	Synthese von 4-Thio-UTP . . . . .	41
2.22.2	Durch UV-Licht katalysierte Affinitätsmarkierung von Protein/RNA- Komplexen . . . . .	43
2.23	Phosphorylierungsanalysen von TAC-Proteinen . . . . .	44
2.24	Sequenzierung von TAC-Proteinen . . . . .	44
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>46</b>
3.1	Aufreinigung von 'Transkriptionsaktiven Chromosomen' . . . . .	46
3.1.1	Proteinzusammensetzung von TAC-Extrakten . . . . .	48
3.1.2	Aufreinigung von Chloroplasten in Anwesenheit von Natriumchlorid	49
3.1.3	Extraktion von TAC-Proteinen . . . . .	50
3.2	Charakterisierung von 'Transkriptionsaktiven Chromosomen' . . . . .	52

---

3.2.1	Transkriptionsaktivität der TAC-RNAP . . . . .	52
3.2.2	Einfluß von Transkriptionshemmstoffen auf die TAC-RNAP . . . . .	53
3.2.3	Phosphorylierungsanalysen mit TAC-Extrakten . . . . .	56
3.2.4	Zweidimensionale Auftrennung von TAC-Proteinen . . . . .	56
3.2.5	Sequenzierung von TAC-Proteinen . . . . .	59
3.2.6	Immundetektion von Proteinen in transkriptionsaktiven Extrakten .	61
3.2.7	Untersuchungen zum Einfluß von spezifischen Antikörpern gegen TAC-Proteine auf die Transkriptionsaktivität der TAC-RNAP . . . . .	66
3.3	Charakterisierung des ETCHED1-Proteins . . . . .	69
3.3.1	Das ETCHED1-Protein . . . . .	69
3.3.2	<i>In vitro</i> -Transkription und -Translation von <i>etched1</i> und Immunpräzipitation des ET1-Proteins . . . . .	71
3.3.3	Aufreinigung von TAC-Extrakten aus der et1-R Mutante von Mais	73
3.3.4	Transkriptionsaktivität und Proteinzusammensetzung von TAC-Extrakten aus der et1-R-Linie von Mais . . . . .	73
3.3.5	Immundetektion von ET1 und der $\alpha$ -UE der PEP . . . . .	74
3.3.6	Genspezifität der TAC-RNAP . . . . .	76
3.3.7	Induktion einer Endonukleaseaktivität der TAC-RNAP durch ET1 .	79
3.3.8	Bestimmung der Länge von 'cleavage'-Produkten durch die Endonukleaseaktivität von RNA-Polymerasen . . . . .	81
3.3.9	Entwicklungsabhängige Expression von <i>zr</i> -Genen . . . . .	82
3.4	Aufreinigung von löslichen RNAP-Extrakten aus Maischloroplasten . . . . .	86
3.4.1	Proteinzusammensetzung von sRNAP-Extrakten und Immundetektion von Proteinen . . . . .	86
3.4.2	Einfluß des DNA-'Templates' auf die Transkriptionsaktivität . . . . .	86
3.4.3	Genspezifität von sRNAP-Extrakten . . . . .	88
3.4.4	Einfluß von Hemmstoffen auf die Transkriptionsaktivität . . . . .	91
3.4.5	Einfluß von Hemmstoffen auf die Genspezifität der sRNAP . . . . .	92
3.4.6	Photaffinitätsmarkierung von Proteinen . . . . .	93
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>95</b>

---

4.1	Zusammensetzung und Charakterisierung von 'Transkriptionsaktiven Chromosomen' aus Mais-, Gerste- und Spinatchloroplasten . . . . .	95
4.2	Charakterisierung des ETCHED1-Proteins . . . . .	104
4.2.1	Nachweis von ETCHED1 im TAC . . . . .	104
4.2.2	Funktion des ETCHED1-Proteins im TAC . . . . .	107
4.3	Zusammensetzung und Transkriptionsaktivität von sRNAP-Extrakten aus Maischloroplasten . . . . .	115
4.4	Ausblick . . . . .	119
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>121</b>
<b>6</b>	<b>Summary</b>	<b>123</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>124</b>
	<b>Anhang</b>	<b>142</b>

## Abbildungsverzeichnis

1	Schema des differentiellen Membrantransfers von Proteinen	36
2	Schema zur Markierung von Proteinen durch Photoaffinitätsmarkierung	42
3	Elutionsprofil der 1.Gelfiltration bei der TAC-Isolierung	47
4	Agarosegel zur Bestimmung des DNA-Gehaltes von TAC-Fraktionen	48
5	Proteinzusammensetzung von TAC-Extraten	49
6	Proteinzusammensetzung von TAC-Extrakten nach NaCl-Behandlung	50
7	Vergleich von Proteinextraktionsmethoden für TAC-Extrakte	52
8	Transkriptionsaktivität der TAC-RNAP in Gegenwart von Hemmstoffen	54
9	Transkriptionsaktivität von RNAPs in Gegenwart von Hemmstoffen	55
10	Phosphorylierung von TAC-Proteinen	57
11	Zweidimensionale Auftrennung von TAC-Proteinen	58
12	Sequenzierung von TAC-Proteinen nach Gelelektrophorese	60
13	Immunologischer Nachweis der $\alpha$ -UE der PEP in TAC-Extrakten	62
14	Immunologischer Nachweis von NEPs vom Phagentyp in TAC-Extrakten	63
15	Immunologischer Nachweis des MFP1-Proteins in TAC-Extrakten	64
16	Immunologischer Nachweis des TCP34-Proteins in TAC-Extrakten	65
17	Immunologischer Nachweis des ETCHED1-Proteins in TAC-Extrakten	66
18	Transkriptionsaktivität der TAC-RNAP in Gegenwart von Antikörpern	67
19	Phänotyp der ETCHED1-defizienten Maislinie et1-R	70
20	Struktur des ETCHED1-Proteins	71
21	<i>In vitro</i> -Translation und Immunpräzipitation des ETCHED1-Proteins	72
22	Transkriptionsaktivität der TAC-RNAP aus der et1-R-Mutante	74
23	Proteinzusammensetzung von TAC-Extrakten aus der et1-R-Mutante	75
24	Immunologischer Nachweis der $\alpha$ -UE der PEP und von ETCHED1 in TAC-Extrakten	76
25	Hybridisierung von TAC-RNAP-Transkripten mit plastidären Genfragmenten	78
26	Transkription der TAC-RNAP in Gegenwart von Cordycepin	80
27	Bestimmung der Länge von Hydrolyseprodukten der TAC-RNAP	82
28	Entwicklungsabhängige Expression von <i>zr</i> -Genen	84
29	Proteinzusammensetzung von sRNAP-Extrakten	87
30	Immunologischer Nachweis der $\alpha$ -UE der PEP und von ETCHED1 in sRNAP-Extrakten	88
31	Transkriptionsaktivität von sRNAP-Extrakten in Abhängigkeit vom DNA-'Template'	89
32	Hybridisierung von sRNAP-Transkripten mit plastidären Genfragmenten	90
33	Transkriptionsaktivität von sRNAP-Extrakten in Gegenwart von Hemmstoffen	91
34	Photoaffinitätsmarkierung von sRNAP-Proteinen	93
35	Modell zur Funktion von Elongationsfaktoren mit RNAPs	108
36	Struktur der RNAP II	111
37	Struktur der RNAP II mit TFIIS und der eubakteriellen RNAP mit GreB	113

**Tabellenverzeichnis**

1	Untereinheiten der plastidär kodierten RNAP	36
2	Gensonden	42
3	Transkriptionsraten verschiedener TAC-Extrakte	53
4	Sequenzdaten von TAC-Proteinen	61

## Abkürzungen und Symbole

Abb.	Abbildung
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylamino]-1-propan-sulfonat
cDNA	komplementäre DNA
cpm	'counts per minute'
CTP	Cytidin-5'-triphosphat
3'dATP	3'-Desoxy-Adenosin-5'-triphosphat (Cordycepin)
DEPC	Diethylpyrrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DOC	Natrium-Deoxycholat
DTT	Dithiothreitol
ECL	'enhanced chemiluminescence'
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EST	'expressed sequence tag'
g	Zentrifugalbeschleunigung
GFP	'green fluorescence protein'
GTP	Guanidin-5'-triphosphat
kb	Kilobasenpaare
kD	Kilodalton
mRNA	Boten ('messenger')-RNA
MW	Molekulargewicht
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NEP	nukleär kodierte RNA-Polymerase
NTP	Nukleosidtriphosphat
<sup>32</sup> P	Phosphor-Isotop mit der Massenzahl 32
3'OMeGTP	3'-O-Methyl-Guanidin-5'-triphosphat
PEP	plastidär kodierte RNA-Polymerase
PKA	Proteinkinase A
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPR	'pentatricopeptid repeat'
PSB	'protein sample buffer'
ptDNA	plastidäre DNA
RNA	Ribonukleinsäure
RNAP	DNA-abhängige RNA-Polymerase

---

RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
RuBisCO	Ribulose-1,5-Bisphosphat Carboxylase/Oxygenase
<sup>35</sup> S	Schwefel-Isotop mit der Massenzahl 35
SDS	Natriumdodecylsulfat
SLF	'sigma like factors'
sRNAP	lösliche DNA-abhängige RNA-Polymerase
sUTP	4-Thio-Uridin-5'-triphosphat
Tab.	Tabelle
TAC	'Transkriptionsaktives Chromosom'
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA
TES	Tris-EDTA-SDS
TP	Transkriptionspuffer
TPR	'tetratricopeptid repeat'
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
u	'units' (Enzymeinheit)
UDP	Uridin-5'-diphosphat
UE	Untereinheit
UTP	Uridin-5'-triphosphat
Vol.	Volumen
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht/Volumen
ZR	'zinc-ribbon'

Anmerkung :

Wird in der vorliegenden Arbeit von 'Wasser' gesprochen, so handelt es sich, soweit nicht anders vermerkt, um in einer Millipore-Anlage (Seradest SD 2000, USF Elga Seral, Ransbach-Baumbach) entmineralisiertes Wasser. Bei der Aufarbeitung von Proben, die RNA enthielten, wurde stets mit DEPC behandeltes Wasser verwendet.

Englische Termini, für die es keine gebräuliche deutsche Übersetzung gibt oder die Eingang in die deutsche Fachliteratur gefunden haben, wurden als solche beibehalten und in Anführungszeichen gesetzt.

# 1 Einleitung

## 1.1 Evolution der Plastiden

Die Plastiden sind die Charakterorganellen aller eukaryotischen, photoautotrophen Organismen. Sie sind der Ort der Photosynthese, bei der aus Kohlendioxid und einem Elektronendonator unter Verwendung von Lichtenergie organische Substanzen synthetisiert werden. Dabei wird die Strahlungsenergie der Sonne in chemische Energie umgewandelt. Die Photosynthese von Cyanobakterien, Algen und Höheren Pflanzen bedient sich des Wassers als Elektronenquelle, wobei Sauerstoff freigesetzt wird. Neben der Photosynthese sind weitere biologisch wichtige Stoffwechselreaktionen in den Plastiden lokalisiert, wie Aminosäure- und Fettsäurebiosynthese, sowie die Produktion vieler Substanzen des Sekundärstoffwechsels, unter anderem über den Shikimatweg.

Plastiden besitzen eine doppelte Hüllmembran, die das Stroma und das innere Membransystem der Thylakoide umschließt. Dies ist in ihrer evolutionären Herkunft begründet. Die Plastiden der Algen und Höheren Pflanzen sind der Endosymbiontentheorie zufolge aus phagozytierten Cyanobakterien entstanden (GRAY, 1989; SCHIMPER, 1883). Durch die Aufnahme eines photosynthetisch aktiven Bakteriums durch eine eukaryotische Zelle entstand der Vorläufer der Pflanzenzelle (MCFADDEN, 1999). Ein ähnlicher Mechanismus wird auch für die Entstehung der Mitochondrien angenommen, wobei diese Endosymbiose viel früher stattfand und in diesem Fall Purpurbakterien als Endosymbionten gelten (GRAY, 1989).

Plastiden besitzen ein eigenes genetisches System mit eigener DNA und einem Proteinbiosyntheseapparat. Im Laufe der Evolution erfuhren die Plastiden durch einen Gentransfer von den Organellen in den Zellkern eine zunehmende Kontrolle durch ihren eukaryotischen Wirt (MARTIN und HERRMANN, 1998; MARTIN *et al.*, 2002).

Die Expression der plastidären Gene und die Funktionalität der Stoffwechselprozesse hängen stark von nukleär kodierten Faktoren ab, die im Cytoplasma synthetisiert und posttranslational in die Plastiden importiert werden. Auch ein Großteil der plastidären Strukturproteine ist im Zellkern kodiert. Dieser Umstand machte die Entwicklung eines Importapparates zum Transport von Proteinen aus dem Cytoplasma durch die Hüllmembranen notwendig (HEINS und SOLL, 1998). Plastiden können nicht *de novo* gebildet werden und

gehen stets aus Teilungsprozessen durch sich selbst hervor.

Es gibt neben den photosynthetisch aktiven Chloroplasten eine Reihe weiterer Typen von Plastiden. Sie können sich aus undifferenzierten Proplastiden in unterschiedlichen Geweben zu Speicherorganellen für Stärke (Amyloplasten), Proteine (Proteinoplasten) oder Fette (Elaioplasten) und zu Chromoplasten mit Farbpigmenten in Blütenblättern differenzieren.

## 1.2 Das plastidäre Genom

Die Plastiden besitzen aufgrund ihrer Herkunft ein eigenes Genom (Plastom), welches das Restgenom des freilebenden prokaryotischen Endosymbionten, des Cyanobakteriums, darstellt. Es wurde 1962 von RIS und PLAUT entdeckt und liegt als zirkuläre, doppelsträngige DNA vor (MANNING *et al.*, 1971). In Chloroplasten von Mesophyllzellen liegt es in jeweils vielen ( $\sim 100$ ) Kopien vor, so daß bei etwa 100 Plastiden pro Zelle eine Kopienzahl der plastidären DNA (ptDNA) von bis zu 10.000 vorliegen kann. Die Größe des stark konservierten Plastoms schwankt je nach Pflanzenart zwischen 120 und 160 kb (PALMER, 1990). Ausnahmen bilden einerseits parasitisch lebende Pflanzen wie *Epifagus virginiana* oder der plastidenbesitzende Malariaerreger *Plasmodium falciparum*, die wegen ihrer nicht photosynthetischen Lebensweise weitaus geringere Plastomgrößen von 70 bzw. 29 kb aufweisen (MARTIN und HERRMANN, 1998; MORDEN *et al.*, 1991). Andererseits gibt es auch größere Genome, wie bei der Rotalge *Porphyra* sp. mit 191 kb oder bei *Pelargonium*-Arten mit 220 kb (PALMER, 1991). Die Reduktion des plastidären Genoms ist auf einen Gentransfer in den Kern oder auf einen Genverlust zurückzuführen. Von den über 3000 angenommenen Proteinen des ursprünglichen Cyanobakteriums sind mittlerweile nur noch 5-10 % in den Plastiden kodiert, und sie machen ca. 10-20 % der gesamten Proteinmenge in Chloroplasten aus (MARTIN *et al.*, 2002). Kein Stoffwechselweg, der in den Plastiden lokalisiert ist, kann allein durch plastidär kodierte Enzyme von statten gehen. Alle Stoffwechselwege sind abhängig vom Import kernkodierter Proteine, die im Cytoplasma translatiert und anschließend in die Plastiden importiert werden. Die im Plastom verbliebenen 50-200 Gene kodieren für Proteine des Photosyntheseapparates, des plastidären Transkriptionsapparates, für ribosomale rRNA und Transfer-RNAs (tRNA) sowie für den NADH-Dehydrogenase-Komplex. Weitere Gene stellen offene Leserahmen (ORF: 'open reading frame' oder *ycf*: 'hypothetical chloroplast reading frame') dar, die für Peptide kodieren können, die noch

nicht nachgewiesen worden sind und deren Funktion unbekannt ist (SUGIURA, 1992).

Durch den gemeinsamen evolutionären Ursprung der Plastiden ist die Struktur des Genoms relativ konserviert. In den vergangenen Jahren konnte eine ganze Reihe plastidärer Genome komplett sequenziert werden (KIM und LEE, 2004; STOEBE *et al.*, 1998). Die Organisation der Gene ist ebenfalls konserviert. Viele Gene liegen wie bei den Cyanobakterien in Operonen vor. Gene können sich auch überlappen, und der nichtkodierende Bereich ist im Vergleich zum eukaryotischen Zellkern äußerst klein. Die Transkription der Gene erfolgt durch verschiedene RNA-Polymerasen.

Bakterien und Archaeobakterien besitzen jeweils eine RNA-Polymerase, wohingegen Eukaryoten allein im Kern über drei RNA-Polymerasen verfügen. Hinzu kommen in der Euzyte noch weitere RNA-Polymerasen, die in den Mitochondrien und Plastiden lokalisiert sind.

### 1.3 RNA-Polymerasen

DNA-abhängige RNA-Polymerasen (RNAP) sind die Schlüsselenzyme der Transkription und Genexpression in allen lebenden Organismen. Bei der Transkription wird die Sequenz des codogenen DNA-Stranges in komplementäre RNA kopiert. Dieses Transkript kann als mRNA für die Translation eines Proteins dienen, als strukturelle RNA, als Bestandteil der Ribosomen oder als tRNA-Adaptermolekül bei der Proteinbiosynthese. RNA kann auch selbst regulatorische Funktion haben oder auch das Genom eines RNA-Virus sein (VON HIPPEL, 1998).

Die Synthese eines Transkripts kann in mehrere Teilschritte gegliedert werden. Zunächst erfolgt die Bindung der RNAP an den Promotor und die Transkriptioninitiation. Nach Ablösen des Promotors von der RNAP kommt es zur Elongation und nach Fertigstellung des Transkriptes zur Termination und Freisetzung der RNA. All diese Schritte stehen unter regulatorischer Kontrolle. Am besten untersucht ist die RNAP aus Bakterien, deren katalytische Kerneinheit aus fünf Untereinheiten ( $\alpha_2 \beta \beta' \omega$ ) besteht und zusammen mit einem  $\sigma$ -Faktor das Holoenzym bildet (BORUKHOV und NUDLER, 2003; EBRIGHT, 2000; ZHANG *et al.*, 1999). Der  $\sigma$ -Faktor ist für die Promotorerkennung und Transkriptioninitiation verantwortlich. Nach der Synthese von 9-12 Nukleotiden geht der Komplex mit der Dissoziation des  $\sigma$ -Faktors und Bildung eines hochprozessiven Elongationskomplexes in die Elongationsphase über, die keinen weiteren Energieverbrauch erfordert (NUDLER, 1999; UPTAIN *et al.*,

1997).

RNA-Polymerasen sind prozessive Enzyme. Wird die naszierende RNA aus dem Elongationskomplex entlassen, ist eine erneute Bindung und Fortführung der Transkription nicht möglich (UPTAIN *et al.*, 1997). RNAPs verfügen im Gegensatz zu DNA-Polymerasen über keine Korrekturfunktion während der Synthese. Einen speziellen 'proof-reading'-Mechanismus über eine Exonukleaseaktivität gibt es nicht. Es konnte jedoch eine schwache 5'→3'-Endonuklease-Aktivität nachgewiesen werden. Ob diese *in vivo* auch Korrekturfunktion hat, ist bislang noch unklar (KASSAVETIS und GEIDUSCHEK, 1993). Während der Elongation kann ein Transkriptionskomplex aus unterschiedlichen Gründen verschiedene Konformationen annehmen, wobei es auch zum Stoppen der Elongation kommen kann (ERIE, 2002; FISH und KANE, 2002). Ein arretierter Elongationskomplex kann die Transkription meist erst nach Bindung weiterer Faktoren wieder aufnehmen. Diese Faktoren induzieren die Endonukleaseaktivität der RNAP, die es ermöglicht, nahe dem 3'-Ende des naszierenden Transkripts ein wenige Basenpaare umfassendes RNA-Stück abzutrennen, während das 5'-Ende stabil an der RNAP gebunden bleibt. Am neu entstandenen 3'-Ende kann dann die Elongation entsprechend der DNA-Matrize fortgesetzt werden (SURRETT *et al.*, 1991). RNAP-Elongationskomplexe sind im allgemeinen extrem resistent gegenüber Dissoziation und Denaturierung, hohen Salzkonzentrationen, Ionen- und Gelfiltration und nativer Gelelektrophorese (ARNDT und CHAMBERLIN, 1990; LIVIN *et al.*, 1987).

## 1.4 Plastidäre RNA-Polymerasen

Da die Gene in Plastiden und auch Mitochondrien für funktionelle Genprodukte kodieren, ist auch eine organellenspezifische Transkription erforderlich. Dazu bedienen sich Plastiden eines sehr komplexen Transkriptionsapparates. Während die Mitochondrien nur über eine kernkodierte RNAP verfügen, die den RNAPs der Bakteriophagen ähnelt (WEIHE *et al.*, 1997), wird die Transkription des Plastoms von mehreren RNAPs übernommen (HESS und BÖRNER, 1999; IGLOI und KÖSSEL, 1992; MALIGA, 1998). Hierbei unterscheidet man grundsätzlich zwei Typen von RNAPs: eine in der Plastide selbst kodierte RNAP, die PEP ('plastid encoded polymerase'), und die kernkodierten RNAPs, die als NEP ('nucleus encoded polymerase') bezeichnet werden. Die Anzahl der in Plastiden aktiven nukleär kodierten RNAPs ist bislang nicht geklärt und kann auch zwischen verschiedenen Pflanzenarten va-

riieren.

#### 1.4.1 Die plastidär kodierte RNA-Polymerase

Die plastidär kodierte RNAP besteht aus mehreren Untereinheiten. Aufgrund der Ähnlichkeit zu der eubakteriellen RNAP bezeichnet man diese in Analogie zur RNAP aus *Escherichia coli* als  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\beta'$  und  $\beta''$ -Untereinheiten (ALLISON *et al.*, 1996; HU und BOGORAD, 1990; HU *et al.*, 1991). Es ist außerdem bekannt, daß die Promotorerkennung durch die PEP wie bei den Eubakterien über 'sigma like factors' (SLFs) vermittelt wird (LINK, 1996). Diese Faktoren sind jedoch nicht im Plastidengenom kodiert. Es gibt eine kleine Genfamilie nukleärer Gene, die für Proteine mit Ähnlichkeit zu den  $\sigma$ -Faktoren kodieren, die wiederum in die Plastiden importiert werden (ALLISON, 2000). Sowohl die hohe Sequenzhomologie als auch eine *in vitro* Rekonstruktion von SLFs mit der RNAP aus *E. coli* deuten darauf hin, daß sie eine identische Funktion haben wie die  $\sigma$ -Faktoren der Bakterien (BEARDSLEE *et al.*, 2002; HAKIMI *et al.*, 2000; HANAOKA *et al.*, 2003; PRIVAT *et al.*, 2003).

Die Gene, die für die PEP-Untereinheiten kodieren, werden als *rpo*-Gene bezeichnet und weisen eine hohe Sequenzhomologie zu den RNAP-Untereinheiten aus *E. coli* auf. Das Bakterium enthält die kodierenden Gene *rpoA*, *rpoB* und *rpoC* für die Untereinheiten  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\beta'$ , wobei die  $\alpha$ -Untereinheit im Holoenzym als Dimer vorliegt. Diese Zusammensetzung gilt auch für Plastiden und Cyanobakterien. Lediglich aus dem *rpoC*-Gen haben sich in den Plastiden zwei Gene (*rpoC1* und *rpoC2*) entwickelt (BERGSLAND und HASELKORN, 1991; KANEKO *et al.*, 1996).

Die Position der Gene auf dem Plastom ist ebenfalls aufgeklärt. Das *rpoA*-Gen ist am distalen Ende eines großen polycistronischen Operons mit Genen für ribosomale Untereinheiten lokalisiert. Die Gene *rpoB*, *rpoC1* und *rpoC2* liegen hintereinander und bilden ein separates Operon (SHINOZAKI *et al.*, 1986). Die Zusammensetzung dieses Kernkomplexes aus den vier Untereinheiten konnte in allen bislang untersuchten, nicht parasitisch lebenden Pflanzen bestätigt werden. Die Größe der Genprodukte ausgewählter Pflanzen ist in Tab. 1 angegeben.

Tab. 1 : Untereinheiten der plastidär kodierten RNA-Polymerase: Gene und die entsprechenden Genprodukte ausgewählter Pflanzen mit Angabe des Molekulargewichts (HU und BOGORAD, 1990; HU *et al.*, 1991; SUZUKI *et al.*, 2004).

Genbezeichnung	RNAP-Untereinheit	Größe des kodierten Proteins	Pflanze
<i>rpoA</i>	$\alpha$ -UE	~ 39 kD	Tabak, Mais
<i>rpoB</i>	$\beta$ -UE	~ 120 kD	Tabak, Mais
<i>rpoC1</i>	$\beta'$ -UE	~ 79 kD	Tabak, Mais
<i>rpoC2</i>	$\beta''$ -UE	~ 155 kD ~ 180 kD	Tabak, Spinat Reis, Mais

#### 1.4.2 Kernkodierte RNA-Polymerasen

Außer der PEP enthalten Plastiden mindestens eine weitere RNAP, die im Zellkern kodiert ist und in die Plastiden importiert wird. Es wurden in der Vergangenheit zunehmend Hinweise auf die Existenz einer NEP erhalten. Es wurde zunächst ein zweites Transkriptionssystem in den Plastiden postuliert, da auch die PEP selbst transkribiert werden muß. Aber auch Pflanzen mit ribosomendefizienten Plastiden, wie die 'Albostrians'-Linie von Gerste (HESS *et al.*, 1993; HÜBSCHMANN und BÖRNER, 1998) oder hitzegebleichte Gerstenkeimlinge (FALK *et al.*, 1993), können mangels eines Translationsapparates keine PEP synthetisieren. Es konnte jedoch eine Transkriptionsaktivität nachgewiesen werden, die nur einer kernkodierten RNAP zuzuschreiben ist. Einen noch deutlicheren Hinweis lieferten transgene Linien von *Nicotiana tabacum*, bei denen die *rpo*-Gene für die einzelnen Untereinheiten der PEP spezifisch deletiert wurden und in denen trotzdem eine Akkumulation von Transkripten festzustellen war (ALLISON *et al.*, 1996; HAJDUKIEWICZ *et al.*, 1997; SERINO und MALIGA, 1993).

Auch in parasitischen Pflanzen wie dem Wurzelparasiten *Epifagus virginiana* oder einigen Arten der Gattung *Cuscuta* wird das gesamte Plastom trotz fehlender funktioneller *rpo*-Gene transkribiert (KRAUSE *et al.*, 2003; MORDEN *et al.*, 1991). In Spinat konnte ein 110 kD-Protein in einer transkriptionsaktiven Plastidenfraktion detektiert werden, welches nicht einer PEP-Untereinheit zuzuordnen war und Promotoren vom T3/T7-Phagentyp erkannte (LERBS *et al.*, 1985, 1988; LERBS-MACHE, 1993). Mittlerweile sind bei verschiedenen Pflanzen Gene identifiziert worden, die für eine in die Plastiden importierte RNAP ko-

dieren. Diese ähnelt der mitochondrialen RNAP, die ihrerseits Homologien zu den RNAPs aus T7- und T3-Bakteriophagen aufweist (CHANG *et al.*, 1999; HEDTKE *et al.*, 1997, 1999; YOUNG *et al.*, 1998). Das abgeleitete Molekulargewicht dieser phagenähnlichen, kernkodierten RNAP liegt in allen Pflanzen, in denen derartige NEPs gefunden wurden, bei etwa 110 kD.

In zunehmendem Maße wird diskutiert, ob nur eine oder aber mehrere NEPs in Plastiden aktiv sind. Einige plastidäre Gene besitzen multiple Promotoren (s.1.5), die durch unterschiedliche RNAPs in Interaktion mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren abgelesen werden. Bei der Untersuchung des *rrn*-Operons wurde eine dritte Transkriptionsaktivität beschrieben, die sich von den bislang bekannten unterscheidet (BLIGNY *et al.*, 2000). Das als 'NEP-2' bezeichnete Enzym erkennt T7-Promotoren, wird von Tagetitoxin, einem Transkriptionshemmstoff der PEP, nicht beeinflusst und zeigt im Hinblick auf Promotorerkennung und Nachweis über entsprechende Antikörper keine Übereinstimmung mit dem zuvor charakterisierten 110 kD-Protein ('NEP 1') (LERBS-MACHE, 1993).

Die Kerngene, die für RNAPs vom T7-/T3-Phagentyp kodieren, werden meistens unter der Bezeichnung *rpoT*-Gene zusammengefaßt. Im Kerngenom der Grünalge *Chlamydomonas* sp. ist bislang nur eine nukleär kodierte RNAP vom Phagentyp lokalisiert worden, deren Zielort die Mitochondrien sind. Monokotyle Pflanzen besitzen offenbar zwei nukleär kodierte RNAPs vom Phagentyp, von denen jeweils eine in die Mitochondrien importiert wird und die andere in die Plastiden (CHANG *et al.*, 1999; HEDTKE *et al.*, 2002; IKEDA und GRAY, 1999; KUSUMI *et al.*, 2004). Im Genom von *Arabidopsis thaliana* fand man zunächst ebenfalls nur zwei Gene für phagenähnliche RNAPs (HEDTKE *et al.*, 1997). Durch die komplette Sequenzierung des Genoms von *A. thaliana* wurde noch ein weiteres Gen für eine RNAP vom T7-/T3-Phagentyp entdeckt. Die prozessierten Genprodukte der drei *rpoT*-Gene haben alle ein Molekulargewicht von ca. 110 kD. Mit Hilfe von GFP-'Targeting'-Experimenten konnten die Zielorte dieser nukleär kodierten RNAPs festgestellt werden. Dabei wurden die schon zuvor untersuchten Genprodukte von *rpoT;1* bzw. *rpoT;3* entsprechend der bekannten Transitsequenzen in Mitochondrien bzw. Plastiden importiert. Das *rpoT;2*-Genprodukt hat jedoch offenbar eine komplexe Transitsequenz, durch die es in beide Organellen gelangen kann (HEDTKE *et al.*, 2000). *rpoT;2* ist vermutlich aus einer Duplikation von *rpoT;1* mit einer um 40 Aminosäuren erweiterten Präsequenz hervorge-

gangen. Bei *N. tabacum* beträgt die Anzahl der bakteriophagenähnlichen RNAPs sogar sechs, doch stellt sich die Situation ähnlich wie in *A. thaliana* dar. Im allotetraploiden Genom dieser Tabakart sind jeweils alle drei Gene ihrer beiden Vorfahren *N. sylvestris* und *N. tomentosiformes* integriert (HEDTKE *et al.*, 2002). Das Genom des Moores *Physcomitrella patens* verfügt hingegen nur über zwei Kopien phagenähnlicher RNAPs, die durch eine Genduplikation entstanden sind. Beide Kopien besitzen Transitsequenzen sowohl für die Mitochondrien als auch die Plastiden (KABEYA *et al.*, 2002; RICHTER *et al.*, 2002). Da die Kerngenome von monokotylen Pflanzen abgesehen von Reis noch nicht vollständig sequenziert sind, kann hier über das Vorhandensein einer zusätzlichen dritten RNAP vom Phagentyp noch keine Aussage getroffen werden.

Die beiden RNAP-Typen in den Plastiden können unabhängig voneinander arbeiten, wie anhand von PEP-defizienten transgenen Pflanzen, denen die entsprechenden *rpo*-Gene fehlen, gezeigt werden konnte (HAJDUKIEWICZ *et al.*, 1997). Dabei reicht die NEP offenbar zur Erhaltung des Kompartiments Plastide aus. Allerdings können Tabakpflanzen, denen das funktionelle *rpoB*-Gen fehlt, lediglich heterotroph wachsen und weisen keine Granathylakoide auf (ALLISON *et al.*, 1996). Es gibt zudem außerhalb der Plastiden keine funktionellen Kopien von *rpo*-Genen, die eine Deletion in den Plastiden selbst ersetzen können (SERINO und MALIGA, 1993). Die beiden RNAP-Typen sind für die Transkription unterschiedlicher Gene verantwortlich. Diese Spezifität wird unter anderem durch die Nutzung verschiedener Promotoren reguliert. Die plastidär kodierte RNAP scheint hauptsächlich Photosynthesegene zu transkribieren, während die NEP hauptsächlich die sogenannten 'housekeeping'-Gene transkribiert (MALIGA, 1998). Nach diesem Modell wird zusätzlich noch eine entwicklungsabhängige Regulation angenommen: In Proplastiden liegt eine NEP-Aktivität vor, während in sich entwickelnden Chloroplasten hauptsächlich die PEP aktiv ist.

## 1.5 Plastidäre Promotoren und Spezifität von NEP und PEP

Promotoren sind Sequenzbereiche auf der DNA, die in der Regel vor dem Startpunkt der Gene liegen und bei der Transkription und der Genregulation eine entscheidende Rolle spielen. Regulatorische Bindeproteine können mit ihnen interagieren, den Kontakt mit RNAPs vermitteln und so die Transkription einleiten beziehungsweise beeinflussen.

Jede RNAP nutzt spezifische Promotoren.

Die PEP ähnelt in ihrem Aufbau der eubakteriellen RNAP aus *E. coli*, entsprechend sind auch eubakterielle Promotoren in Plastiden vorhanden. Diese zeichnen sich durch die charakteristischen Sequenzboxen TATAAT (-10-Box) und TTGACA (-35-Box) aus und werden als Promotoren vom -10/-35 $\sigma^{70}$ -Typ (GRUISSEM und TONKYN, 1993; HESS und BÖRNER, 1999; IGLOI und KÖSSEL, 1992) oder als PEP-Promotoren bezeichnet (HAJDUKIEWICZ *et al.*, 1997). Die Erkennung findet durch die kernkodierte SLFs statt (ALLISON, 2000; PRIVAT *et al.*, 2003).

Die nukleär kodierten RNAPs nutzen andere Promotoren, bei denen eine YRTA-Box als Konsensussequenz identifiziert wurde (HAJDUKIEWICZ *et al.*, 1997; HESS und BÖRNER, 1999; KAPOOR und SUGIURA, 1999; MIYAGI *et al.*, 1998). Sie ähneln daher mitochondrialen und Bakteriophagen-Promotoren. Zusätzlich weisen viele Gene stromaufwärts eine GAA-Box auf. Anhand des NEP-Promotors von *atpB* konnte gezeigt werden, daß dieses Sequenzmotiv die Transkription durch die NEP verstärkt (XIE und ALLISON, 2002). Es gibt aber auch plastidäre Gene, die entweder nicht über diese Promotorstrukturen verfügen und vermutlich interne Promotoren besitzen, oder Gene, die über mehrere Promotoren verfügen (BLIGNY *et al.*, 2000; HESS und BÖRNER, 1999; SRIRAMAN *et al.*, 1998).

Aufgrund ihrer Promotoren werden die plastidären Gene in drei Klassen eingeordnet. Gene mit PEP-Promotoren werden nach HAJDUKIEWICZ *et al.* (1997) als Klasse I-Gene bezeichnet und umfassen weitgehend Photosynthesegene, solche mit NEP-Promotoren werden der Klasse III zugeordnet. Unter diese fallen auch die sogenannten 'Haushaltsgene', die für die Aufrechterhaltung der Grundfunktionen in Plastiden verantwortlich sind. Dazu zählen unter anderem die Gene, die für die Untereinheiten der PEP kodieren (HAJDUKIEWICZ *et al.*, 1997). Zur Klasse II werden solche Gene gezählt, die sowohl PEP- als auch NEP-Promotoren besitzen, wie *atpB*, *rpb32* und das *rrn*-Operon, das neben zwei PEP-Promotorregionen (IRATNI *et al.*, 1997) noch Erkennungssequenzen für eine NEP enthält (BLIGNY *et al.*, 2000).

## 1.6 Der plastidäre Transkriptionsapparat

Der plastidäre Transkriptionsapparat kann biochemisch in zwei verschiedene transkriptionsaktive Fraktionen mit unterschiedlichen Eigenschaften getrennt werden. Durch Frak-

tionierung erhält man eine an die Membranfraktion gebundene RNAP-Aktivität, die in Form 'Transkriptionsaktiver Chromosomen' vorliegt, und eine lösliche RNAP-Aktivität (sRNAP).

### 1.6.1 Das 'Transkriptionsaktive Chromosom'

Erstmals wurden 'Transkriptionsaktive Chromosomen' (TAC) von HALLICK *et al.* (1976) isoliert. Dabei handelte es sich um einen plastidären Extrakt aus *Euglena gracilis*, der aus plastidärer DNA und Proteinen besteht und nach Zugabe von freien Nukleotiden in der Lage ist, RNA zu synthetisieren. Dabei werden die vor der Isolierung der Plastiden *in vivo* initiierten Transkripte *in vitro* verlängert. Man kann also von einem Transkriptions-Elongationskomplex sprechen, der die vorhandene ptDNA als Matrize nutzt. Dieser DNA/Protein-Komplex ist mit der Thylakoidmembran assoziiert und ist Bestandteil der Nukleotide in den Plastiden (KUROIWA, 1991; TEWARI und WILDMAN, 1969). In der Folgezeit konnten TAC-Extrakte aus Spinat (BRIAT und MACHE, 1980; KRAUSE und KRUPINSKA, 2000; LEBRUN *et al.*, 1986), Erbse (TEWARI und GOEL, 1983), Senf (REISS und LINK, 1985) und Gerste (FALK, 1994) präpariert und analysiert werden. Die ursprünglich aus *Euglena gracilis* gewonnene TAC-Fraktion transkribiert nur ribosomale RNA (NARITA *et al.*, 1985; RUSHLOW *et al.*, 1980) und unterscheidet sich in dieser Hinsicht von TAC-Extrakten Höherer Pflanzen, die alle RNA-Typen bilden können (KRUPINSKA und FALK, 1994; REISS und LINK, 1985). Die genaue Proteinzusammensetzung des TAC ist bislang noch nicht aufgeklärt. Von den über 40 Proteinen sind nachweislich zwei Untereinheiten der PEP, die  $\alpha$ - (SUCK *et al.*, 1996) und die  $\beta$ -Untereinheit (KRAUSE und KRUPINSKA, 2000) vorhanden. Dazu kommen noch eine Reihe weiterer Proteine, die mit der TAC-RNAP assoziiert sind oder damit kolokalisieren und deren Funktionen bislang noch ungeklärt sind. Dazu gehören z.B. DNA- und RNA-Bindeproteine und Proteine, die die Nukleotide an den Membranen verankern wie das PEND-Protein (SATO und OHTA, 2001).

### 1.6.2 Die lösliche RNAP

Eine sRNAP-Fraktion kann unter hohen Salzbedingungen und in Abwesenheit von Magnesiumionen von der Membranfraktion und der ptDNA getrennt werden. Sie wurde in Mais (HU und BOGORAD, 1990; HU *et al.*, 1991; KIDD und BOGORAD, 1980; SMITH

und BOGORAD, 1974), der Erbse (RAJASEKHAR *et al.*, 1991; RAJASEKHAR und TEWARI, 1995) und in Spinat (LERBS *et al.*, 1985) charakterisiert. In Senf gibt es offenbar zwei Formen dieser sRNAP, die sich in ihrer Sensitivität gegenüber Rifampicin unterscheiden (PFANNSCHMIDT und LINK, 1994, 1997). Die Präparation erfolgte jeweils über eine Säulenchromatographie lysierter Plastiden, eine Fällung der transkriptionsaktiven Fraktionen und differentielle Gradientenzentrifugation. In allen Fällen konnten Untereinheiten der PEP in diesen sRNAP-Extrakten nachgewiesen werden. Lösliche Proteinfraction aus Plastiden enthalten auch nukleär kodierte RNAPs. So wurden in diesen Fraktionen sowohl eine RNAP mit ähnlichen Eigenschaften zu der RNAP von T7-Phagen (LERBS-MACHE, 1993) als auch das bereits erwähnte zweite NEP-Protein isoliert, welches nicht diesem RNAP-Typ entspricht (BLIGNY *et al.*, 2000). sRNAP-Fractionen können auch über eine differentielle Ammoniumsulfatfällung der löslichen Proteine von Plastiden gewonnen werden. In einer derart präparierten Fraction aus Tabakplastiden wurde ebenfalls eine RNAP isoliert, die ähnliche Eigenschaften hat wie die T7-Phagen-RNAP (LIERE und MALIGA, 1999).

## 1.7 Zielsetzung dieser Arbeit

In dieser Arbeit sollen zunächst 'Transkriptionsaktive Chromosomen' (TAC) aus Mais-, Gerste- und Spinatchloroplasten vergleichend untersucht werden. Dabei soll von den bislang beschriebenen Aufreinigungsmethoden ausgegangen und diese gegebenenfalls verbessert werden. Es sollen sowohl die Proteinzusammensetzung der TAC-Komplexe untersucht werden als auch immunologische Versuche zum Nachweis einzelner Komponenten der kernkodierten und plastidär kodierten RNA-Polymerasen und weiterer in dieser Fraktion vermuteter Proteine durchgeführt werden.

Im Mittelpunkt dieser Arbeit soll die Identifizierung und Charakterisierung von Proteinen stehen, die im TAC an der Transkription beteiligt sind oder regulatorische Funktionen besitzen. Bisher konnten die an der RNA-Synthese beteiligten Proteine nur über eine Photoaffinitätsmarkierung sichtbar gemacht werden, ohne jedoch weitere Rückschlüsse auf deren Struktur und Funktion ziehen zu können. Wenn einzelne Proteine im TAC immunologisch oder über Sequenzanalyse identifiziert werden können, soll eine funktionelle Charakterisierung dieser Proteine erfolgen.

Des Weiteren soll auch eine lösliche transkriptionsaktive Fraktion isoliert und charakterisiert werden. Dabei interessiert vorrangig die Frage, welche RNAPs in dieser Fraktion vorhanden sind und Transkriptionsaktivität zeigen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien und Enzyme

Soweit nicht anders angegeben, stammten die Laborchemikalien von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Sigma (München) und Fischer Scientific (Düsseldorf) und waren von reinster Qualität.

Die radioaktiven Nukleotide  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-CTP,  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP,  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP (jeweils 3000 Ci/mmol) sowie der <sup>35</sup>S-Methionin/<sup>35</sup>S-Cystein-Mix (1000 Ci/mmol) wurden von der Firma Hartmann (Braunschweig) bezogen. Die Enzyme RNase T1 und DNase I (RNase-frei) waren Produkte der Firma Roche (Mannheim). Nukleosid-5'-Diphosphat-Kinase sowie Proteinkinase K stammten von der Firma Sigma (München). Die verwendeten Restriktionsenzyme und das Enzym Polynukleotidkinase stammten von der Firma MBI Fermentas (St. Leon-Rot).

### 2.2 Anzucht von Bakterien und Plasmidisolierung

#### LB - Medium :

- 1 % (w/v) Trypton
- 0,5 % (w/v) Hefeextrakt
- 1 % (w/v) Natriumchlorid

Bakterienstämme von *Escherichia coli*, die Plasmide mit einer der Gensonden (2.4) enthielten, wurden in 3 ml LB-Medium mit 0,1 mg/ml Ampicillin über Nacht bei 37°C in einem Schüttelinkubator bei 170 UpM angezogen. Aus den Kulturen wurden die Plasmide nach BIRNBOIM und DOLY (1997) isoliert.

### 2.3 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen und Isolierung von DNA-Fragmenten

DNA wurde sequenzspezifisch mit Restriktionsendonukleasen (10 u/ $\mu$ l) der Firma MBI Fermentas, St. Leon-Rot, nach Angaben des Herstellers geschnitten.

## 2.4 Gensonden

Zur Herstellung von DNA-’Dot-Blot’-Membranen für die Hybridisierung von RNA-Transkripten oder für die Hybridisierung von RNA-Membranen (’Northern Blot’) mit spezifischen DNA-Fragmenten wurden verschiedene Gensonden verwendet.

Tab. 2 : Übersicht über die verwendeten Gensonden

Gensonden für Dot-Blot-Membranen		
Gen	kodiertes Protein	Herkunft
<i>ndhH</i>	UE des NADH-Dehydrogenase-Komplexes	<i>Hordeum vulgare</i>
<i>rpoB</i>	$\beta$ -UE der PEP	<i>Hordeum vulgare</i>
<i>rpoC2</i>	$\beta''$ -UE der PEP	<i>Zea mays</i>
<i>rpoC1</i>	$\beta'$ -UE der PEP	<i>Zea mays</i>
<i>rpoB</i>	$\beta$ -UE der PEP	<i>Zea mays</i>
<i>rpoA</i>	$\alpha$ -UE der PEP	<i>Zea mays</i>
<i>rpl,rps</i>	ribosomale RNAs	<i>Hordeum vulgare</i>
<i>ORF23+63</i>	open reading frame	<i>Hordeum vulgare</i>
<i>4.5S+5SrDNA</i>	ribosomale RNAs	<i>Hordeum vulgare</i>
<i>23SrDNA</i>	ribosomale RNA	<i>Hordeum vulgare</i>
<i>16SrDNA</i>	ribosomale RNA	<i>Hordeum vulgare</i>
<i>trnE,Y,D</i>	Transfer-RNAs	<i>Hordeum vulgare</i>
<i>trnE</i>	Transfer-RNA	<i>Hordeum vulgare</i>
<i>psaB</i>	UE des Photosystem I	<i>Hordeum vulgare</i>
<i>psbF</i>	UE des Photosystem II	<i>Hordeum vulgare</i>
<i>psbE</i>	UE des Photosystem II	<i>Hordeum vulgare</i>
<i>psbD</i>	UE des Photosystem II	<i>Hordeum vulgare</i>
<i>psbC</i>	UE des Photosystem II	<i>Hordeum vulgare</i>
<i>psbA</i>	UE des Photosystem II	<i>Hordeum vulgare</i>
<i>petA</i>	UE des Cytochrom $b_6f$ -Komplexes	<i>Hordeum vulgare</i>
<i>atpA</i>	$\alpha$ -UE der ATP-Synthase	<i>Hordeum vulgare</i>
<i>rbcL</i>	große UE der RuBisCO	<i>Hordeum vulgare</i>
weitere Gensonden		
<i>et1</i>	ETCHED1-Protein	<i>Zea mays</i>
<i>rbcS</i>	kleine UE der RuBisCO	<i>Zea mays</i>
<i>Hvzr1</i>	HvZR1-Protein	<i>Hordeum vulgare</i>
<i>Hvzr2</i>	HvZR2-Protein	<i>Hordeum vulgare</i>

In Tab. 2 sind die eingesetzten Gensonden mit den kodierten Proteinen und der Herkunftspflanze aufgeführt. Die verwendeten Sonden für DNA-’Dot-Blot’-Membranen sind identisch mit denen bei FALK *et al.* (1993) eingesetzten DNA-Fragmenten.

## 2.5 *In vitro*-Transkription und -Translation von Plasmid-DNA

Die Transkription und Translation von DNA erfolgte *in vitro* mit dem ’TNT Coupled Wheat Germ Extrakt System’ (Promega, Madison) nach Angaben des Herstellers, wobei 1  $\mu$ g linearisiertes Plasmid eingesetzt wurde. Ein Plasmid, welches die komplette cDNA-Sequenz des *et1*-Gens enthält, wurde freundlicherweise von der AG Wienand, Hamburg, zur Verfügung gestellt (GARG, 2002).

## 2.6 Pflanzenmaterial

Spinat (*Spinacea oleracea* L.) stammte von der Firma Köhn und Brötzmann (Kiel). Die Pflanzen wurden am Vortag der Aufarbeitung geliefert und ca. 24 Stunden bei 4°C dunkel gelagert, um eine Stärkeakkumulation zu vermeiden. Die Blattspreiten wurden mit Leitungswasser gewaschen, von den Mittelrippen befreit und in kleine Stücke geschnitten. Diese Arbeiten erfolgten im Kühlraum bei 4°C. Gerste (*Hordeum vulgare* var. Steffi L.) und Mais (*Zea mays* L.) wurden in den Gewächshäusern der Universität zu Kiel auf Vermiculit oder Erde bei 21°C und einem 16 Std. Hell-/ 8 Std. Dunkel-Rhythmus angezogen und entsprechend verarbeitet.

## 2.7 Plastidenisolierung

### 2.7.1 Isolierung von Chloroplasten aus Gerste und Mais

#### Isolierungsmedium A :

50 mM Tris / HCl pH 8,0

300 mM Mannitol

3 mM EDTA

1 % (w/v) BSA

10 mM DTT

Saccharosekissen :

50 mM Tris / HCl pH 8,0

0,5 M Saccharose

20 mM EDTA

Isolierungsmedium B :

50 mM Tris / HCl pH 8,0

0,3 % (w/v) Saccharose

20 mM EDTA

Zur Isolierung größerer Mengen von Chloroplasten bzw. Thylakoidmembranen für TAC-Präparationen aus Gerste und Mais wurde nach POULSEN (1983) vorgegangen. Jeweils 50 g Blattmaterial wurden in 250 ml Isolierungsmedium A im 'Waring Blendor' für 3 x 5 Sek. homogenisiert. Nach einer Filtration durch 3 Lagen Miracloth (Calbiochem, La Jolla, USA) erfolgte eine Zentrifugation für 20 Min. (3000xg, 4°C). Die Sedimente wurden in 5 ml Isolierungspuffer A je 50 g Blattmaterial resuspendiert und durch Nylongaze mit einer Maschenweite von 30 µm (Hydro Bios, Kiel) filtriert. Maximal 16 ml des Filtrats wurden auf ein Saccharosekissen von 200 ml geschichtet und zentrifugiert (20 Min., 3000xg, 4°C). Die sedimentierten Plastiden wurden in 50 ml Isolierungspuffer B je 50 g Blattmaterial resuspendiert und erneut zentrifugiert. Nach Wiederholung dieses Waschschrtes wurden die Plastiden bei -80°C gelagert oder für eine anschließende TAC-Isolierung mit Lysislösung aufgebrochen und die Thylakoidmembranen isoliert (2.7.3).

**2.7.2 Isolierung von Chloroplasten über Percoll-Stufengradienten**GM - Puffer :

50 mM HEPES / NaOH pH 6,8

330 mM Sorbit

2 mM EDTA

2 mM DTT

1 mM Natriumpyrophosphat

1 mM Magnesiumchlorid

1 mM Manganchlorid

PCBF :

3 % PEG 6000

1 % BSA

1 % Ficoll

in Percoll

Percoll - Gradientenlösungen :

50 mM HEPES / KOH pH 8,0

80 / 40 % PCBF

330 mM Sorbit

2 mM EDTA

2 mM DTT

1 mM Magnesiumchlorid

0,017 % (w/v) Glutathion

Waschmedium :

50 mM HEPES / KOH pH 8,0

330 mM Sorbit

Zur Gewinnung reiner Chloroplastenfraktionen, z.B. für die Aufreinigung von löslichen sRNAP-Extrakten (2.9), wurden Percoll-Stufengradienten eingesetzt. Dabei wurde ein leicht modifiziertes Protokoll nach GRUISSEM *et al.* (1986b) und KRUPINSKA (1992) verwendet. Alle Arbeiten erfolgten im Kühlraum bei 4°C. Jeweils 50 g Blattmaterial wurden in 200 ml GM-Puffer im 'Waring Blendor' (2 x 2 Sek. 'low', 2 x 2 Sek. 'high') homogenisiert und durch drei Lagen Mirocloth (Calbiochem, La Jolla, USA) filtriert. Nach einer Zentrifugation (30 Sek., 3000xg, 4°C) wurde das Sediment in einem geringen Volumen GM-Puffer resuspendiert und auf einen zweistufigen Percollgradienten (80 % / 40 %) geschichtet. Die intakten Chloroplasten sammelten sich nach einer Zentrifugation (20 Min., 5000xg, 4°C) auf dem unteren Percollkissen und konnten mit einer Pasteurpipette abgenommen werden. Nach zwei Waschschritten mit 2-3 Volumen Waschmedium und Zentrifugation (1 Min., 5000xg, 4°C) wurden die isolierten Chloroplasten bei -80°C gelagert.

### 2.7.3 Isolierung von Plastidenmembranen aus Spinatblättern

#### Medium A - Isolierungsmedium :

20 mM Natriumpyrophosphat / HCl pH 6,5

330 mM Saccharose

4 mM Natriumascorbat

5 mM Magnesiumchlorid

#### Lysislösung :

10 mM Tricine / NaOH pH 7,8

0,6 mM Magnesiumchlorid

500  $\mu$ l PMSF-Stammlösung je 200 ml Schocklösung

#### Tricine - Puffer :

50 mM Tricine /NaOH pH 7,8

3 mM Magnesiumchlorid

#### Medium B - Saccharoselösung :

64 % (w/v) Saccharose in Tricine-Puffer

50  $\mu$ l PMSF-Stammlösung je 50 ml Medium B

#### Medium C :

15 ml Medium B je 100 ml Schocklösung

#### PMSF - Stammlösung :

Eine Spatelspitze PMSF in 1 ml Ethanol

Die Isolierung von Chloroplasten aus Spinat erfolgte im Kühlraum bei 4°C in Anlehnung an die Methode von DOUCE *et al.* (1973), wie sie auch bei WEBER (1995) beschrieben ist. Etwa 2 kg gewaschene und entstieltete Spinatblätter wurden im 'Waring Blendor' in insgesamt 3 l Medium A homogenisiert (2 x 2 Sek. 'low', 2 x 2 Sek. 'high'). Das Homogenat wurde durch drei Lagen Miracloth (Calbiochem, La Jolla, USA) filtriert und anschließend 10 Min. bei 3500xg (4°C) zentrifugiert. Die Sedimente wurden in ca. 1 l Medium A resuspendiert. Durch eine weitere Filtration durch Nylongaze einer Maschenweite von 30  $\mu$ m (Hydro Bios, Kiel) erfolgte eine Abtrennung von Zellaggregaten. Die intakten Chloroplasten wurden durch Zentrifugation (s.o.) sedimentiert und durch Aufnahme in insgesamt 200 ml Lysislösung aufgebrochen. Diese Suspension wurde mit 30 ml Medium B versetzt und

10 Min. in einem Swing-Out-Rotor zentrifugiert (12000xg, 4°C). Das gewonnene Sediment aus plastidären Hüll- und Thylakoidmembranen wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

#### **2.7.4 Isolierung von plastidärer DNA**

Für die Analyse der Transkriptionsaktivität von löslichen RNAP-Fractionen (2.9) mußte dem Extrakt exogene DNA hinzugesetzt werden. Hierfür wurde angereicherte Plastiden-DNA aus Mais verwendet. Diese wurde ausgehend von isolierten Chloroplasten (2.7.1) präpariert. 5 ml sedimentierter Plastiden wurden mit 2 ml Isolierungsmedium B (2.7.1) versetzt und Magnesiumchlorid bis zu einer Endkonzentration von 10 mM hinzugefügt. Es folgte eine Inkubation mit DNase I (1000 u, 5 Min.) zur Entfernung nicht-plastidärer DNA und anschließend eine Inkubation mit Proteinase K (400 µg, 15 Min.). Die Plastiden wurden durch Zugabe von 1 Vol. Phenol und kräftiges Schütteln aufgebrochen und die freigesetzte ptDNA durch eine zweimalige Extraktion der wässrigen Phase mit 1 Vol. Chloroform extrahiert. Die DNA wurde daraufhin gefällt (2.12.1), in TE-Puffer gelöst und auf die gewünschte Konzentration von 0,7 mg/ml verdünnt.

#### **2.7.5 Isolierung von Gesamtproteinextrakten aus Chloroplasten**

Die Isolierung von Proteinextrakten aus Plastiden erfolgte ausgehend von isolierten Chloroplasten (2.7.1,2.7.3). Die löslichen Proteine wurden durch eine 10minütige Inkubation der Chloroplasten in 1 x PSB (2.17.1) bei 95°C extrahiert. Nach kurzem Abkühlen der Probe auf Eis wurden unlösliche Bestandteile durch Filtration durch Miracloth (Calbiochem, La Jolla, USA) und anschließende Zentrifugation (2 Min., 14000xg, 4°C) abgetrennt. Die Bestimmung der Proteinkonzentration des Lysates erfolgte nach BRADFORD (1976) (2.16.1).

## 2.8 Isolierung von 'Transkriptionsaktiven Chromosomen'

### 2.8.1 Solubilisierung der Membranproteine

#### TAC - Triton - Puffer

50 mM	Tris / HCl pH 7,6
4 mM	EDTA
2 mM	DTT
25 % (v/v)	Glycerin
3 % (v/v)	Triton X-100
(2 mM	Natrium-Deoxycholat, DOC)

#### Protaminsulfatlösung :

10 mg/ml Protaminsulfat in TAC-Triton-DOC-Puffer

#### Heparinlösung :

5 mg/ml Heparin in TAC-Triton-DOC-Puffer

Die Präparation von TAC-Extrakten erfolgte nach einer von HALLICK *et al.* (1976) beschriebenen und von KRAUSE (1999) modifizierten Methode. 15-25 g der isolierten Hüll- und Thylakoidmembranen (2.7.3) wurden in dem zehnfachen Volumen TAC-Triton-DOC-Puffer resuspendiert und in einem Glaspotter durch dreimaliges Auf- und Abbewegen des Stempels homogenisiert. Die Behandlung mit den nichtionischen Detergenzien Triton X-100 und DOC führt zur Ablösung der RNAP-Aktivität von den Thylakoidmembranen, wobei die Bindung der TAC-RNAP an die ptDNA weiterhin bestehen bleibt. Dieser Schritt wurde im Abstand von 3 Min. viermal wiederholt und das Homogenat anschließend 30 Min. (20000xg, 4°C) zentrifugiert, um unlösliche Membranbestandteile und Stärkereste abzutrennen. Letztere wurden noch einmal mit wenig TAC-Triton-DOC-Puffer reextrahiert, die Überstände vereinigt und einer Protaminsulfatfällung unterzogen.

### 2.8.2 Protaminsulfatfällung

Protaminsulfat ist ein Polykation, mit dem DNA/Protein-Komplexe gefällt und angereichert werden können (YOUNG und WHITLEY, 1975). Dem erhaltenen Überstand aus 2.8.1 wurde bis zu einer Endkonzentration von 0,5 mg/ml schrittweise Protaminsulfatlösung zu-

gesetzt. Nach 30minütigem Rühren bei RT wurde die Suspension zentrifugiert (15 Min., 23000xg, 4°C), und nach zweimaligem Waschen des Sedimentes mit TAC-Triton-DOC-Puffer wurde das Präzipitat in 30 ml Heparinlösung resuspendiert. Das Polyanion Heparin interagiert mit Protaminsulfat, bildet einen Komplex und löst das Protaminsulfat von den DNA/Protein-Komplexen. Durch Zentrifugation (15 Min., 28000xg, 4°C) wurden diese Aggregate und unlösliche Bestandteile von der TAC-RNAP entfernt. Der Überstand wurde mittels Gelfiltrationschromatographie aufgetrennt (2.8.3).

### 2.8.3 Gelfiltrationschromatographie

Bei der Gelfiltration werden Proteine und Proteinkomplexe nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Für die Anreicherung von TAC-Extrakten wurde eine mit TAC-Triton-Puffer äquilibrierte Sepharose CL4B-Säule (Gelbettvolumen ca. 2 l, Amersham Biosciences, Freiburg) bei einer Laufgeschwindigkeit von 0,8 ml/Min. verwendet. Die Filtration fand im Kühlraum bei 4°C statt. Das Eluat wurde in Fraktionen von je 500 Tropfen (ca. 6,5 ml) aufgefangen. Die Fraktionen wurden über Agarose-Gelelektrophorese (2.12.2) oder Absorptionmessungen bei Wellenlängen von 260 und 280 nm im Spektralphotometer (Uvikon 922, Kontron, München) auf ihren DNA- und Proteingehalt hin untersucht. Die DNA enthaltenden Fraktionen, in denen auch Transkriptionsaktivität (2.21) nachgewiesen werden konnte, wurden vereinigt, à 2 ml aliquotiert, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80°C gelagert.

Leersäulen, Gelfiltrationsmedium, Pumpen und Fraktionssammler sowie ein Kalibrierungsset für die Bestimmung des Molekulargewichtes der eluierten Fraktionen ('HMW gel filtration calibration kit') stammten von der Firma Amersham Biosciences (Freiburg).

### 2.8.4 Abtrennung von Detergenzien

PIN - Puffer (Proteinase - Inhibitor) :

50 mM Tris / HCl pH 7,6

4 mM EDTA

2 mM DTT

2 Tabletten / 100 ml 'Complete Proteinase Inhibitor' (Roche, Mannheim)

Zur weiteren Aufreinigung der TAC-RNAP und zur Entfernung der Detergenzien Triton

X-100 und Natrium-Deoxycholat wurden ein Wasch- und ein zweiter Gelfiltrationsschritt angeschlossen. Jeweils 8 Aliquots à 2 ml aus der ersten Gelfiltration wurden mit jeweils 20  $\mu$ l Protaminsulfat-Lösung (10 mg/ml in PIN-Puffer) versetzt und 30 Min. bei RT inkubiert. Die durch 15minütige Zentrifugation (16000xg, 4°C) erhaltenen Sedimente wurden dreimal mit PIN-Puffer gewaschen, anschließend in Heparinlösung (1,6 mg in 500  $\mu$ l PIN-Puffer) aufgenommen und 30 Min. bei RT geschüttelt. Nach erneuter Zentrifugation (s.o.) wurde der Überstand auf eine mit PIN-Puffer äquilibrierte Sepharosesäule (CL4B, Gelbettvolumen ca. 30 ml) aufgetragen. Die Gelfiltration erfolgte bei 4°C (Laufgeschwindigkeit 0,2 ml/min). Das Eluat wurde in Fraktionen von je 20 Tropfen (ca. 500  $\mu$ l) aufgefangen. Die transkriptionsaktiven, DNA enthaltenden Fraktionen wurden per Transkriptionsassay (2.21) oder Agarose-Gelelektrophorese (2.12.2) bestimmt und durch Ultrazentrifugation (22 Std., 100000xg, 4°C) ankonzentriert. Das Sediment wurde in 100  $\mu$ l PIN-Puffer mit 10 % (v/v) Glycerin aufgenommen und bei -80°C gelagert.

## 2.9 Isolierung von löslichen RNA-Polymerase-Fraktionen

### Lysispuffer A :

10 mM Tris / HCl pH 8,8

100 mM Natriumchlorid

1 mM EDTA

7 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol

50  $\mu$ g/ml PMSF

### Lysispuffer B :

5 mM Tris / HCl pH 8,0

100 mM Natriumchlorid

10 mM Magnesiumchlorid

50 % (v/v) Glycerin

3 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol

50  $\mu$ g/ml PMSF

Lagerpuffer :

40 mM	Tris / HCl pH 7,9
10 mM	Natriumchlorid
5 mM	DTT
5 % (v/v)	Glycerin

Die Isolierung löslicher Extrakte mit einer nicht an die plastidäre DNA gebundenen Transkriptionsaktivität (sRNAP) aus Chloroplasten von Mais erfolgte in Anlehnung an LIERE und MALIGA (1999). Zunächst wurden Chloroplasten ausgehend von ca. 400 g Blattmaterial über einen Percoll-Stufengradienten angereichert (2.7.2) und anschließend in 60 ml Lysispuffer A lysiert. Nach Homogenisierung im 'Waring Blendor' (3 x 3 Sek. 'high') und einer 30minütigen Inkubation auf Eis wurde dem Extrakt 60 ml Lysispuffer B zugesetzt. Es folgte eine Ultrazentrifugation (4 Std., 100000xg, 4°C) zur Sedimentierung ungelöster Bestandteile. Dem Überstand wurde nach 30minütiger Inkubation auf Eis 42,12 g fein gemörsertes Ammoniumsulfat (Sättigung ca. 58%) zugefügt und diese Lösung weitere 30 Min. gerührt. Die gefällten Proteine wurden durch Zentrifugation (60 Min., 18000xg, 4°C) ankonzentriert, in 4 ml Lagerpuffer resuspendiert und in einen Dialyseschlauch überführt. Es folgte eine Dialyse über Nacht gegen 2 l Lagerpuffer. Der erhaltene Extrakt konnte wie in 2.21 beschrieben auf seine Transkriptionsaktivität hin überprüft und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert werden.

## 2.10 Isolierung von DNA aus Pflanzenmaterial

Extraktionspuffer :

25 mM	Tris / HCl pH 7,5
4 M	Guanidiniumthiocyanat
10 mM	EDTA
2 % (w/v)	N-Laurosy sarcosinat
100 mM	$\beta$ -Mercaptoethanol

TE - Puffer :

10 mM	Tris / HCl pH 8,0
1 mM	EDTA

Die Isolierung von DNA aus Gerstenblättern erfolgte nach ALBAUM (1993). 50-400 mg Blattmaterial wurden in flüssigem Stickstoff homogenisiert und in 1 ml Extraktionspuffer aufgenommen. Nach Abtrennung ungelöster Bestandteile durch Zentrifugation (5 Min., 16000xg) wurde der klare Überstand zweimal mit 0,5 Vol. Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) und einmal mit 0,25 Vol. Chloroform/Methanol (24:1) extrahiert. Durch Zugabe von 0,1 Vol. 3 M Natriumacetat und 1 Vol. Isopropanol wurden die Nukleinsäuren gefällt und durch Zentrifugation (10 Min., 16000xg) sedimentiert. Das Sediment wurde mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 300  $\mu$ l TE-Puffer resuspendiert. RNA wurde mit 30  $\mu$ g RNase A für 30 Min. bei 37°C verdaut und die DNA durch eine erneute Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion (25:24:1) und anschließende Fällung (2.12.1) konzentriert und in 50-100  $\mu$ l TE-Puffer aufgenommen.

## 2.11 Isolierung von RNA aus Pflanzenmaterial

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Pflanzengewebe erfolgte mit dem peqGOLD TriFast™ Reagenz der Firma peqLAB (Erlangen) nach deren Angaben. Dabei wurden 300-400 mg Pflanzengewebe in flüssigem Stickstoff homogenisiert und 5 Min. in 1 ml TriFast™ stehen gelassen. Nach Zugabe von 0,2 ml Chloroform und einer Inkubation von 10 Min. bei RT wurde durch Zentrifugation (5 Min., 12000xg) eine Phasentrennung erreicht. Die RNA befindet sich in der oberen wässrigen Phase und wurde mit 0,5 ml Isopropanol gefällt. Nach Sedimentierung (10 Min., 12000xg, 4°C) wurde die RNA zweimal mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und in einer geeigneten Menge (20  $\mu$ l) mit DEPC behandeltem Wasser gelöst und konnte bei -80°C gelagert werden.

## 2.12 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

### 2.12.1 Fällung von Nukleinsäuren

Die Fällung von in wässriger Lösung vorliegenden Nukleinsäuren erfolgte durch Zugabe von 0,1 Vol. 4 M Natriumchlorid und 2,5 Vol. eiskaltem 100%igem Ethanol und einer anschließenden 30minütigen Inkubation bei -80°C oder über Nacht bei -20°C. Nach einer Zentrifugation (30 Min., 16000xg, 4°C) wurde das Sediment zweimal mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in einem kleinen Volumen Wasser aufgenommen.

### 2.12.2 Agarose-Gelelektrophorese von DNA und RNA

Die gelelektrophoretische Auftrennung von DNA zu analytischen und präparativen Zwecken oder zum Nachweis von ptDNA in gesammelten Fraktionen der Gelfiltrationschromatographie bei der TAC-Präparation (2.8.3) erfolgte nach SAMBROOK *et al.* (1989). RNA wurde ebenfalls nach SAMBROOK *et al.* (1989) in Agarosegelen mit Formaldehyd aufgetrennt.

### 2.12.3 Harnstoffgelelektrophorese von RNA-Abspaltungsprodukten

#### 10 x TBE - Puffer:

900 mM Tris

900 mM Borsäure

20 mM Essigsäure

#### 28 % - Polyacrylamidgel :

1 x TBE

28 % (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid (37:1)

8 M Harnstoff

0,2 % (v/v) Ammoniumpersulfatlösung (10 %)

0,01 % (v/v) TEMED

Diese Art der Gelelektrophorese diente der Analyse von RNA-Abspaltungsprodukten, die durch RNA-Polymerasen erhalten wurden. Durch die hohe Konzentration an Acrylamid konnten RNA-Oligonukleotide detektiert werden. Die Elektrophorese fand in 'Maxigelen' (14 x 18 cm) der Firma Biometra, Göttingen für 12-14 Stunden bei 80 V und 4°C statt. Als Größenstandard wurden analog zu GU und REINES (1995) RNA-Oligonukleotide von 7 bzw. 9 Nukleotiden (CGUUUU/UU) in einer Konzentration von 0,033 mM durch eine T4-Polynukleotidkinase (MBI Frementas, St. Leon-Rot) mit  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP nach Angaben des Herstellers radioaktiv markiert. Die Proben wurden einer Phenol/Chloroformextraktion unterzogen (2.15.2), mit 1 Vol. RNA-Auftragspuffer (SAMBROOK *et al.*, 1989) versetzt und anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt.

### 2.13 Immobilisierung von Nukleinsäuren auf Nylonmembranen

Nukleinsäuren, die zuvor gelelektrophoretisch aufgetrennt worden waren (2.12.2), konnten mittels Kapillartransfer nach Angaben des Herstellers in einem 'reversen' Blot auf Nylonmembranen (Hybond N<sup>+</sup>, Amersham Biosciences, Freiburg) immobilisiert werden. Nach Fixierung auf der Membran (2 Std., 80°C) konnten die transferierten Nukleinsäuren nach jeweils 10minütigen Inkubationen in 5 % (v/v) Essigsäure und in Färbelösung (0,5 M Natriumacetat, 0,004 % (w/v) Methylenblau), gefolgt von mehrmaligem Spülen mit Wasser sichtbar gemacht und dokumentiert werden.

### 2.14 Herstellung von DNA-'Dot-Blot'-Filtern

Gensonden für DNA-'Dot-Blot'-Hybridisierungen wurden in Konzentrationen von 4000, 1000 und 250 fmol mit einer SRC96D Minifold-Apparatur (Schleicher & Schuell, Dassel) nach Angaben des Membranherstellers (Zeta-Probe GT, Biorad, München) auf Nylonmembranen transferiert.

### 2.15 Hybridisierung von immobilisierten Nukleinsäuren mit spezifischen Gensonden

#### 2.15.1 Herstellung radioaktiv markierter DNA-Sonden

Zur Herstellung spezifischer Gensonden für die Hybridisierung mit DNA- oder RNA-Membranen wurden die entsprechenden DNA-Fragmente unter Verwendung von Restriktionsenzymen aus Vektoren herausgeschnitten. Restringierte DNA-Fragmente wurden nach Auftrennung in Agarosegelen (2.12.2) durch Bindung an Silikaharz mit dem 'NucleoSpin'-Gelelutionskit (Machery & Nagel, Düren) isoliert. Eine radioaktive Markierung mit  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP erfolgte mit dem 'HexaLabel<sup>TM</sup> DNA Labelling Kit' (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) nach Angaben des Herstellers mit 100 ng der aufgereinigten DNA. Nicht eingebaute Nukleotide wurden über 'MicroSpin<sup>TM</sup> G-25 columns' nach Angaben des Herstellers (Amersham Biosciences, Freiburg) vor der Hybridisierung abgetrennt.

### 2.15.2 Isolierung von RNA-Transkripten für die Hybridisierung mit DNA auf 'Dot-Blot'-Membranen

Für die Hybridisierung von DNA-'Dot-Blot'-Membranen mit radioaktiv markierten TAC- oder sRNAP-Transkripten wurde zunächst ein zehnfacher Standard-Transkriptionsansatz (2.21) für 30 Min. bei 30°C inkubiert. Anschließend erfolgte ein DNase I- (35 u, 30 Min., 37°C) sowie ein Proteinase K-Verdau (14 µg, 15 Min., 25°C). Die RNA wurde durch Ausschütteln in 1 Vol. Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) und 1 Vol. Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) isoliert und freie Nukleotide mittels Zentrifugation über 'MicroSpin<sup>TM</sup> G-25 columns' (Amersham Biosciences, Freiburg) abgetrennt. Vor der Hybridisierung wurde die RNA 10 Min. bei 95°C denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Die Hybridisierung wurde mit einer RNA-Konzentration von 500.000 cpm / ml Hybridisierungslösung durchgeführt und erfolgte über Nacht bei 63°C.

### 2.15.3 Hybridisierung von DNA-Membranen

Hybridisierungslösung für DNA-Membranen :

5 x           SSPE

5 x           Denhardt's Lösung

0,5 % (w/v) SDS

50-100 µg   denaturierte Herinssperm-DNA je ml Hybridisierungslösung

20 x SSPE :

200 mM   Natriumdihydrogenphosphat / NaOH pH 7,4

3 M        Natriumchlorid

20 mM    EDTA

100 x Denhardt's Lösung :

2 % (w/v) BSA

2 % (w/v) Ficoll

2 % (w/v) Polyvinylpyrrolidon

Die Hybridisierung von Membranen, auf denen DNA immobilisiert wurde, erfolgte nach den Angaben des Handbuches für 'Hybond<sup>TM</sup>-N<sup>+</sup>-positiv geladene Nylonmembranen' (Amersham Biosciences, Freiburg). Anstelle der dort angegebenen 20xSSC-Lösung wurde 20xSSPE verwendet. Nach einer Vorinkubation der Membran in Hybridisierungslösung für 1-3 Stun-

den bei Hybridisierungstemperatur (63°C) erfolgte die Zugabe der radioaktiv markierte Nucleinsäuren (2.15.1, 500.000 cpm / ml Hybridisierungslösung). Die Hybridisierung erfolgte bei 63°C über Nacht. Zur Entfernung von unspezifisch gebundener Sonde wurden die Membranen 10 Min. bei RT in 2xSSPE gewaschen und anschließend für jeweils mindestens 15 Min. in 2xSSPE, 1xSSPE, 0,5xSSPE und 0,2xSSPE mit jeweils 0,1 % SDS (w/v) bei Hybridisierungstemperatur gewaschen. Die Detektion der Hybridisierungssignale erfolgte wie in 2.15.5 beschrieben.

#### 2.15.4 Hybridisierung von RNA-Membranen

Hybridisierungslösung für RNA-Membranen :

5 % (w/v) Dextransulfat

1 % (w/v) SDS

0,75 M Natriumchlorid

50-100 µg denaturierte Herinssperm-DNA je ml Hybridisierungslösung

20 x SSC :

300 mM tri-Natriumcitrat / HCl pH 7,0

3 M Natriumchlorid

Die Hybridisierung von RNA-Membranen erfolgte unter Verwendung der angegebenen Hybridisierungslösung analog zur der von DNA-Membranen (2.15.3). Es wurden jedoch 750.000 cpm / ml Hybridisierungslösung von der radioaktiv markierten Sonde verwendet. Die Hybridisierungstemperatur für Membranen mit immobilisierter RNA lag bei 65°C und als Waschlösung wurde SSC anstelle von SSPE mit jeweils 0,1 % SDS (w/v) verwendet.

#### 2.15.5 Detektion von Hybridisierungssignalen

Hybridisierungssignale wurden entweder durch Exposition auf Röntgenfilm (Hyperfilm MP, Amersham Biosciences, Freiburg) oder mit Hilfe einer 'Image Plate' (Fuji, Tokio, Japan) sichtbar gemacht. Letztere wurde für wenige Stunden bis zu einem Tag exponiert und anschließend in einem Image - Reader (FLA 5000, Fuji, Tokio, Japan) ausgelesen und digitalisiert.

### 2.15.6 Mehrfachverwendung von Membranen

Die gebundenen Sonden konnten in Anlehnung an die Angaben des Membranherstellers (Amersham Biosciences, Freiburg) durch einen zweifachen Waschschrift mit 0,1 % (w/v) kochendem SDS entfernt werden und die Membranen anschließend erneut für weitere Hybridisierungen eingesetzt werden.

## 2.16 Analyse von Proteinproben

### 2.16.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinmenge in einer Probe erfolgte nach der Methode von BRADFORD (1976). 1-10  $\mu\text{l}$  der Probe wurden mit Wasser auf 800  $\mu\text{l}$  aufgefüllt. Nach Zusatz von 200  $\mu\text{l}$  Bradford-Reagenz (BioRad, München) und einer mindestens viertelstündigen Inkubation wurde im Photometer (Uvikon 922, Kontron, München) die Extinktion bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen. Als Referenz diente eine BSA-Eichreihe mit definierten Proteinmengen. Bei geringen Proteinmengen in hoch aufgereinigten TAC-Extrakten war diese Methode nicht sensitiv genug. Zur Messung der Proteinkonzentration wurden hier 'Dot-Blot'-Filter für eine Abschätzung verwendet. Eine bestimmte Menge TAC-Extrakt wurde auf einer PVDF-Membran fixiert und als Vergleich eine BSA-Eichreihe aufgetragen. Vorher wurde die PVDF-Membran 1 Sek. in Methanol äquilibriert, 2 Min. in Wasser geschwenkt und in eine Dot-Blot-Apparatur (Schleicher & Schuell, Dassel) eingespannt. Die Proteinprobe wurde mit Wasser auf 400  $\mu\text{l}$  aufgefüllt, in die Vertiefungen der 'Dot-Blot'-Apparatur pipettiert und unter leichtem Unterdruck auf die Membran übertragen. Es folgte eine Färbung für 2 Min. in 50 % (v/v) Methanol, 7 % (v/v) Essigsäure, 0,1 % (w/v) Coomassie Brilliantblau R250 und eine anschließende Entfärbung in 50 % (v/v) Methanol, 7 % (v/v) Essigsäure bis ein guter Kontrast erzielt war.

### 2.16.2 TCA-Fällung von Proteinen

Bei einem zu großen Volumen von Proteinproben für eine gelelektrophoretische Auftrennung oder zur Abtrennung störender Substanzen vor der Bestimmung des Proteingehaltes von Proteingemischen wurde eine TCA-Fällung (BROWN *et al.*, 1989) durchgeführt. Das Probenvolumen wurde in einem Reaktionsgefäß mit Wasser auf 1 ml aufgefüllt und mit

100  $\mu$ l 0,15 % (w/v) Natrium-Deoxycholat versetzt. Es folgte eine Inkubation von 10 Min. bei RT. Der Probe wurde dann 100  $\mu$ l einer 72%igen (w/v) TCA-Lösung zugesetzt und diese für 5 Min. geschüttelt. Nach einer Zentrifugation (15 Min., 16000xg, RT) wurde das Sediment in 10-30  $\mu$ l 0,2 M NaOH, 0,1 % (w/v) SDS resuspendiert.

### 2.16.3 Phenolextraktion von Proteinen

TAC-Extrakte enthalten große Mengen an ptDNA, die vor einer elektrophoretischen Auftrennung in SDS-Polyacrylamidgelen (2.17.1) mittels Phenolextraktion entfernt werden mußten. Dazu wurden die Proben mit 0,5 Vol. Phenol 20 Min. bei RT geschüttelt. Die nach Zentrifugation (5 Min., 16000xg, RT) gewonnene phenolische sowie die Interphase enthielten die Proteine. Die wäßrige Phase mit den Nukleinsäuren wurde nochmals einer Phenolextraktion unterzogen. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 2 Vol. Wasser erneut reextrahiert, mit 2 Vol. Ethanol (100 %) versetzt und 30 Min. auf Eis inkubiert. Das nach Zentrifugation (45 Min., 16000xg, 4°C) erhaltene Proteinsediment wurde in 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und nach Trocknung bei RT in 1 x PSB (2.17.1) aufgenommen.

### 2.16.4 Chloroform / Methanol - Extraktion von Proteinen

Eine alternative Methode zur phenolischen Extraktion von TAC-Extrakten stellt die Proteinfällung nach WESSEL und FLÜGGE (1984) dar. Hierbei wird 1 Vol. Proteinprobe mit 4 Vol. Methanol vermischt und 10 Sek. zentrifugiert (9000xg, RT). Nach Zugabe von 1 Vol. Chloroform und wiederholter Zentrifugation wird dem Ansatz 3 Vol. Wasser hinzugefügt und dieser 1 Min. bei 9000xg zentrifugiert. Die obere wässrige Phase enthält die Nukleinsäuren und wird verworfen. Die Proteine werden mit 3 Vol. Methanol gefällt, durch eine zweiminütige Zentrifugation (9000xg, RT) sedimentiert und nach einem Waschschrift mit 70 % (v/v) Ethanol in einer geeigneten Menge 1 x PSB (2.17.1) aufgenommen.

## 2.17 Gelelektrophorese von Proteinen

### 2.17.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach LAEMMLI (1970)

5 x PSB (protein sample buffer) :

250 mM Tris / HCl pH 6,8

50 mM DTT

50 % (v/v) Glycerin

10 % (w/v) SDS

0,1 % (w/v) Bromphenolblau

Proteingemische wurden nach der Methode von LAEMMLI (1970) in SDS-Polyacrylamidgelelen nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Das Sammelgel enthielt 5 % (w/v) Acrylamid, für das Trenngel wurden je nach Größe der zu untersuchenden Proteine Konzentrationen von 10-15 % (w/v) Acrylamid sowie lineare Acrylamid-Gradienten-Gele (7,5-15 %) verwendet. Die Proben wurden bei großem Probenvolumen vorher einer Proteinfällung unterzogen (2.16.1), anschließend mit 1/5 Vol. 5 x PSB versetzt und nach fünfminütiger Denaturierung bei 95°C auf das Gel aufgetragen. In 'Minigelen' (7 x 9 cm) betrug die Laufzeit 2-3 Stunden bei einer Stromstärke von 25 mA, in 'Maxigelen' (14 x 18 cm) 12-14 Stunden bei 10-15 mA. Die Elektrophorese wurde bei 4°C durchgeführt. Die Gelapparaturen stammten von der Firma Biometra, Göttingen.

### 2.17.2 'High-Tris'-Gelelektrophorese nach FLING und GREGERSON (1986)

Für die Auftrennung niedermolekularer Proteine wurden 'High-Tris'-Proteingele mit 16-20 % (w/v) Acrylamid verwendet (FLING und GREGERSON, 1986). Das Sammelgel hatte eine Konzentration von 5 % (w/v) Acrylamid. Als Laufpuffer wurde 0,05 M Tris / HCl (pH 8,5), 0,15 M Glycin, 0,1 % (w/v) SDS verwendet.

### 2.17.3 Zweidimensionale Gelelektrophorese

#### Rehydratisierungslösung :

8 M	Harnstoff
1 % (w/v)	CHAPS
0,4 % (w/v)	DTT
0,5 % (v/v)	Pharmalyte pH 3-10
0,1 % (w/v)	Bromphenolblau

Die zweidimensionale Auftrennung von TAC-Extrakten erfolgte nach standardisierten Protokollen in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. M. Sauter (Kiel) in Geräten der Firma Amersham Biosciences, Freiburg. TAC-Extrakte wurden zunächst einer Proteinfällung unterzogen, das Proteinsediment in Rehydratisierungslösung aufgenommen und für 20 Min. bei 25°C im Schüttelinkubator solubilisiert. Anschließend erfolgte innerhalb von 30 Min. eine Markierung der Proteine mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3. Die Probe wurde mit Rehydratisierungslösung mit 0,02 % (w/v) Bromphenolblau auf 350  $\mu$ l aufgefüllt und auf einen 'Immobiline-DryGel-Strip' mit einem pH-Bereich von 3-10 aufgetragen. Die Fokussierung der Proteine anhand ihres isoelektrischen Punktes erfolgte über 22 Std. Anschließend wurde der Gelstreifen auf ein 12%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgelegt und mit 0,5 % (w/v) Agarose, die 0,02 % (w/v) Bromphenolblau enthielt, fixiert. Die Trennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht erfolgte wie in 2.17.1 beschrieben. Die Detektion der fluoreszenzmarkierten Proteine wurde in einem Phosphoimager (Typhoon 9400, Amersham Biosciences, Freiburg) durchgeführt. Da der Farbstoff nur an Lysin bindet und statistisch gesehen jedes Protein nur ein einziges Mal markiert, erlaubt diese Methode, die noch empfindlicher ist als eine Silberfärbung, auch einen quantitativen Vergleich von Proteingemischen.

### 2.17.4 Molekulargewichtsmarker für die Proteingelelektrophorese

Als Größenstandard für die Elektrophorese wurden 'Prestained Protein Ladder (10-180 kD)' (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) und 'Roti-Mark Prestained' (Roth, Karlsruhe) verwendet.

## 2.18 Detektion von gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteinen

Die bei der Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine konnten durch Färbung mit Coomassie-Brilliantblau R250, oder bei geringen Mengen (unter 5  $\mu\text{g}$ ) mittels Silberfärbung nachgewiesen werden.

### 2.18.1 Coomassie-Färbung

Die Anfärbung von Proteinen mit Coomassie Brillant-Blau erfolgte nach der Methode von FAIRBANKS *et al.* (1971). Das Gel wurde eine Stunde in Coomassielösung (0,25 % (w/v) Coomassie-Brilliantblau R250, 10 % (v/v) Essigsäure, 25 % (v/v) Isopropanol) geschwenkt. Die Entfärbung erfolgte in 10 % (v/v) Essigsäure, 10 % (v/v) Isopropanol. Das angefärbte Gel konnte in 10 % (v/v) Essigsäure gelagert werden. Alternativ konnten die Gele auch durch zweifaches Aufkochen in einer Mikrowelle für jeweils 5 Min. (400 Watt) entfärbt werden.

### 2.18.2 Silberfärbung

#### Lösung 1 - Fixierlösung :

50 % (v/v) Methanol  
12 % (v/v) Essigsäure  
112  $\mu\text{l}$  Formaldehyd (37 %) je 100 ml

#### Lösung 2 - Thiosulfatlösung :

65  $\mu\text{l}$  einer 10 %igen (w/v) Thiosulfatlösung auf 50 ml Wasser

#### Lösung 3 - 10 x Silberlösung :

2 % (w/v) Silbernitrat  
0,75 % (v/v) Formaldehyd

#### Lösung 4 - Entwicklungslösung :

6 % (w/v) Natriumcarbonat  
0,05 % (v/v) Formaldehyd  
0,002 % (w/v) Thiosulfat

Lösung 5 - Stopplösung :

50 % (v/v) Methanol

12 % (v/v) Essigsäure

Entsprechend der Methode von BLUM *et al.* (1987) wird das Gel 30 Min. in Lösung 1 fixiert, 3 x 20 Min. in 50 % (v/v) Ethanol gewaschen und 1 Min. in Thiosulfatlösung geschwenkt. Nach dreimaligem Waschen mit Wasser für jeweils 20 Sek. erfolgt eine Inkubation im Dunkeln in 1 x Silberlösung. Es folgt ein Waschschrift (3 x 20 Sek. in Wasser) und die Entwicklung in Lösung 4. Die Färbereaktion wird durch Überführen des Gels in Lösung 5 abgestoppt, und nach ca. 20 Min. können die Gele in 50 % (v/v) Methanol oder 2 % (v/v) Glycerin aufbewahrt oder anschließend getrocknet werden.

**2.18.3 Trocknung und Autoradiographie von Proteingelen**

Für eine langfristige Lagerung von Polyacrylamidgelen wurden diese zwischen handelsüblicher Celluphanfolie getrocknet. Dazu wurde das Gel nach der Anfärbung entweder für mehrere Stunden in 50 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure geschwenkt oder in 2 % Glycerin (v/v) überführt. Anschließend wurde das Gel luftblasenfrei zwischen angefeuchtete Celluphanfolie gelegt, auf einer Glasplatte fixiert und bei RT luftgetrocknet. Alternativ wurden Gele in einer Geltrocknungsanlage (Phero-temp 60, Biotec Fischer, Reiskirchen) unter Vakuum auf Blottingpapier (Schleicher & Schuell, Dassel) getrocknet. Proteingele mit radioaktiv markierten Proteinen (2.22) konnten nach Trocknung mit einer Verstärkerfolie (Hyperscreen, Amersham Biosciences, Freiburg) bei -80°C auf einem Röntgenfilm (Hyperfilm MP, Amersham Biosciences, Freiburg) exponiert werden.

**2.19 Transfer von Proteinen auf Membranen****2.19.1 'Western-Blot'**Kathodenpuffer :

20 mM Tris

150 mM Glycin

0,1 % (w/v) SDS

Anodenpuffer :

20 mM	Tris
150 mM	Glycin
30 % (v/v)	Methanol

Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung von Proteinen wurden diese zur immunologischen Untersuchung auf Nitrozellulosemembranen (Schleicher & Schuell, Dassel) transferiert. Zur Vorbereitung wurde das Gel 10 Min. in Kathodenpuffer inkubiert, während die Nitrozellulose-Membranen 5-10 Min. in Anodenpuffer äquilibriert wurden. Für den Transfer wurde eine Elektroblo-Apparatur (fastblot, Biometra, Göttingen) eingesetzt. Der Transfer erfolgte bei einer Stromstärke von  $0,65 \text{ mA/cm}^2$  Gel in 1,5-2,5 Stunden bei  $4^\circ\text{C}$ . Zur Überprüfung des Transfers konnten die auf den Membranen immobilisierten Proteine mit Ponceau-Lösung (0,2 % (w/v) Ponceau S, 3 % (w/v) TCA) angefärbt werden.

### 2.19.2 Differentieller Membrantransfer

Die nach Photoaffinitätsmarkierungen (2.22) im Polyacrylamidgel aufgetrennten Markierungsprodukte wurden nach der Methode von HANNA (1989) durch differentiellen Transfer in einer 'Phero-blot'-Apparatur (Biotec Fischer, Reiskirchen) auf zwei Membranen übertragen.

Die RNA-Moleküle wandern im elektrischen Feld durch die Zellulosenitratmembran (Schleicher & Schüll, Dassel) hindurch und binden an der Nylonmembran (Hybond N<sup>+</sup>, Amersham Biosciences, Freiburg), während die Protein/RNA-Komplexe an der ersten Membran immobilisiert werden (Abb. 1). Zwischen den beiden Membranen befand sich eine Lage Gel-Blotting-Papier (3MM-Papier, Schleicher & Schuell, Dassel). Der Transfer wurde in 3,5 l Transferpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol) innerhalb von 22 h bei  $4^\circ\text{C}$  und 150 mA Stromstärke durchgeführt.

## 2.20 Immunologische Nachweismethoden

### 2.20.1 Antiseren

- RpoA-Antikörper gegen die  $\alpha$ -Untereinheit (RPO A) der plastidär kodierten RNAP aus Mais (KRAUSE (1999), AG KÖSSEL, Freiburg), Verdünnung 1:600

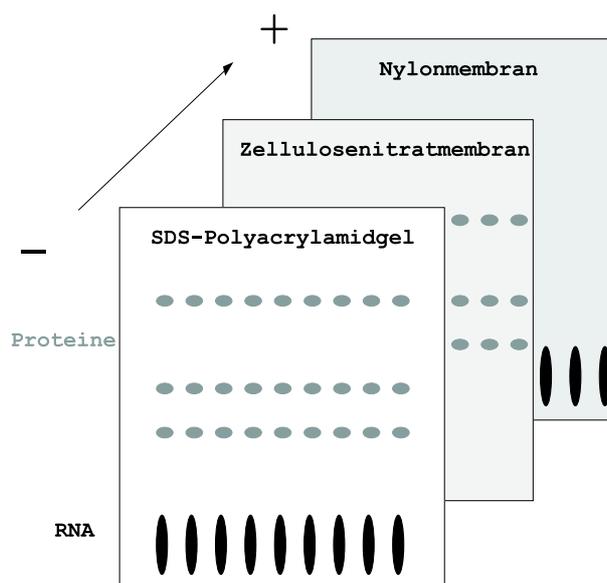


Abb. 1 : Schema des differentiellen Transfers von photoaffinitätsmarkierten Proteinen auf zwei Membranen, verändert nach KRAUSE (1999).

- RpoB-Antikörper gegen die  $\beta$ -Untereinheit (RPO B) der plastidär kodierten RNAP aus Gerste (KRAUSE und KRUPINSKA, 2000), Verdünnung 1:1000
- NEP-Antikörper gegen das Genprodukt einer nukleär kodierten RNAP aus Mais (CHANG *et al.*, 1999), Verdünnung 1:1000
- Zwei NEP-Antikörper (S1 und S2) gegen das Genprodukt von *rpoT;1* aus *A. thaliana* (HEDTKE, B. und BÖRNER, T., Berlin, unveröffentlicht), Verdünnung 1:2000
- Zwei ET1-Peptidantikörper (#1 und #2) gegen das ETCHED1-Protein aus Mais (DA COSTA E SILVA *et al.*, 2004), Verdünnung 1:1000
- TCP34-Antikörper gegen das Protein TCP34 mit einer tetratricopeptid-Domäne aus Spinat, welches in Plastiden importiert wird (SOKOLENKO, A., München, unveröffentlicht), Verdünnung 1:1000
- MFP1-Antikörper gegen das plastidäre an Nukleotide bindende Protein MFP1 aus *A. thaliana* (JEON *et al.*, 2003), Verdünnung 1:1000
- Antikörper gegen die 50S und 30S ribosomalen Untereinheiten aus Spinat (AG FEIERABEND, Frankfurt), Verdünnung 1:500

- LSU-Antikörper gegen die große Untereinheit der RuBisCO aus Mais (GHOSH *et al.*, 1989), Verdünnung 1:1000

### 2.20.2 'ECL'-Nachweis von Proteinen auf Membranen

#### 10 x TBST :

100 mM Tris / HCl pH 8,0

1 M Natriumchlorid

0,5 % (v/v) Tween 20

Proteine können mit Hilfe spezifischer Antikörper auf Membranen nachgewiesen werden, wobei hier auf die von HUMBECK *et al.* (1994) beschriebene Methode zurückgegriffen wurde. Zunächst wurde die Membran mit den immobilisierten Proteinen (2.19.1) mit 4 % (w/v) Milchpulver (Completa, Aldi, Essen) in 1 x TBST blockiert, um unspezifische Bindungen zu unterbinden. Dann erfolgte die Inkubation mit proteinspezifischen Antikörpern. Der Nachweis erfolgte über einen sekundären Antikörper, der gegen den primären proteinspezifischen Antikörper gerichtet ist. Im Falle der ECL-('enhanced chemiluminescence') Detektion ist an den zweiten Antikörper eine Meerrettichperoxidase ('horse radish peroxidase', HRP, Amersham Biosciences, Freiburg) gekoppelt. Dieser Protein-Antikörper-Komplex kann aufgrund der durch die Peroxidaseaktivität vermittelten Chemilumineszenz nach Zugabe von Luminol und Wasserstoffperoxid auf einem Film (Hyperfilm ECL, Amersham Biosciences, Freiburg) nachgewiesen werden.

### 2.20.3 Mehrfachverwendung von 'Western-Blot'-Membranen

Die für Immundetektionen verwendeten Membranen konnten nach fünfminütigem Waschen in 0,2 M NaOH, 0,1 % (w/v) SDS von den gebundenen Antikörpern befreit werden. Nach Spülen mit Wasser und zehnminütigem Schwenken in 1 x TBST konnten weitere Detektionen auf derselben Membran erfolgen, jeweils mit einer erneuten Blockierung unter Verwendung von Milchpulverlösung beginnend (SUCK und KRUPINSKA, 1996).

### 2.20.4 Immunpräzipitation von Proteinen mit spezifischen Antikörpern

#### 2 x IP - Puffer :

100 mM Tris / HCl pH 7,5

0,6 M Natriumchlorid

10 mM EDTA

2% (w/v) Triton X-100

#### Protein - A - Puffer :

50 mM Tris / HCl pH 7,5

150 mM Natriumchlorid

1 mM EDTA

1% (w/v) Triton X-100

#### Waschpuffer :

50 mM Tris / HCl pH 7,5

300 mM Natriumchlorid

0,1 % (w/v) SDS

1 % (w/v) Triton X-100

#### IP - PSB :

125 mM Tris / HCl pH 6,8

10 % (v/v) Glycerin

4 % (w/v) SDS

0,1% (w/v) Bromphenolblau

Für die Immunfällung von markierten Proteinen nach einer *in vitro*-Translation (2.5) mit radioaktiv markierten Aminosäuren wurden die Reaktionansätze zunächst mit Wasser auf 200  $\mu$ l aufgefüllt und mit 200  $\mu$ l 2xIP-Puffer versetzt. Anschließend wurden 40  $\mu$ l der Antikörperlösung und 40  $\mu$ l Protein-A-Sepharose (äquilibriert in Protein-A-Puffer) dazugegeben und 60 Min. bei RT im Schüttelinkubator gerüttelt. Der Ansatz wurde 30 Sek. zentrifugiert (16000xg, RT) und das Sediment viermal mit Waschpuffer und ein weiteres Mal mit 125 mM Tris / HCl (pH 6,8) gewaschen und dann in 50  $\mu$ l IP-PSB aufgenommen und 20 Min. stehengelassen. Nach Zugabe von 1 % (w/v) DTT und Denaturierung der Probe wurde diese in SDS-Acrylamidgelen (2.17.1) elektrophoretisch aufgetrennt.

## 2.21 Transkriptionsaktivität plastidärer RNA-Polymerasen

### 2.21.1 Bestimmung der Aktivität der TAC-RNAP

#### 2 x TP :

60 mM Tris / HCl pH 7,6

20 mM Magnesiumchlorid

je 100  $\mu$ M ATP, GTP, UTP

#### TES :

10 mM Tris / HCl pH 7,6

1 mM EDTA

0,1 % (w/v) SDS

#### Waschpuffer :

0,5 M Di-Natriumhydrogenphosphat

#### Standardreaktionsansatz :

3,5  $\mu$ l 2 x TP

2,0  $\mu$ l TAC-Extrakt

0,5  $\mu$ l  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-CTP

1,0  $\mu$ l Wasser

Zur Bestimmung der Aktivität von RNAPs in TAC-Extrakten wurde die Einbaurrate radioaktiv markierter Nukleotide in RNA gemessen wie bei FALK (1994) und KRAUSE (1999) beschrieben. Ein Standardreaktionsansatz wurde nach einer Inkubation von 30 Min. bei 30°C mit 3  $\mu$ l TES versetzt. Die Transkriptionsaktivität wurde nach der Methode von HALLICK *et al.* (1976) mit Hilfe von DE81-Papier (Schleicher & Schuell, Dassel) bestimmt. Es wurde der prozentuale Anteil der von den RNAPs eingebauten radioaktiv markierten Nukleotide von der insgesamt eingesetzten Menge berechnet. Daraus läßt sich die spezifische Aktivität der RNAPs bestimmen. Als eine Einheit (u) RNAP-Aktivität wurde der Einbau von 1 fmol  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-CTP in die synthetisierte RNA unter Standardbedingungen (30 Min., 30°C) definiert (FALK, 1994).

### 2.21.2 Bestimmung der Aktivität der sRNAP

#### DNA-Stammlösungen :

0,7  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  Kalbsthymus-DNA (Sigma, München) oder

0,7  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  angereicherte Plastiden-DNA (2.7.4)

Bei der Aktivitätsbestimmung löslicher RNAP-Extrakte, die nicht an die ptDNA gebunden ist, wurde dem Standardansatz anstatt Wasser 1  $\mu\text{l}$  DNA-Stammlösung hinzugesetzt, die zuvor 10 Min. bei 95°C denaturiert worden war (PFANNSCHMIDT und LINK, 1994). Es kam sowohl Kalbsthymus-DNA als Plastiden-DNA zum Einsatz.

### 2.21.3 Transkriptionsanalysen in Gegenwart von Antikörpern

Für Transkriptionsanalysen in Gegenwart spezifischer Antikörper wurden einem Standardansatz anstelle von Wasser Antikörperserum in der gewünschten Konzentration hinzugesetzt. Für die Analysen wurden Konzentrationen von 0,5, 1 und 5 g Protein der Antikörperlösungen eingesetzt.

### 2.21.4 Transkriptionsanalysen in Gegenwart von Hemmstoffen

Die Transkription von RNAPs wurde auch in Gegenwart von Transkriptioninhibitoren untersucht. Dabei wurde dem Transkriptionsansatz vor Beginn der Inkubation anstelle von Wasser eine Transkriptionshemmstofflösung hinzugefügt und der Ansatz wenige Minuten auf Eis inkubiert. Die Hemmstoffe  $\alpha$ -Amanitin (Roche, Mannheim), Actinomycin D (Sigma, München) und Tagetitoxin (Biozym, Hess. Oldendorf) wurden mit Wasser auf die gewünschte Konzentration verdünnt. Heparin (Sigma, München) wurde ebenfalls in Wasser, Rifampicin (Merck, Darmstadt) in Methanol (100 %) gelöst. Rifampicin hemmt die bakterielle Transkription. Tagetitoxin ist ein Inhibitor der *E. coli*-RNAP und der PEP.  $\alpha$ -Amanitin hemmt die Transkription der eukaryotischen RNAP II aus dem Zellkern, Actinomycin ist ein unspezifischer Hemmstoff, der an einzel- und doppelsträngige DNA bindet (CHA *et al.*, 2003). Heparin hemmt die Transkription der TAC-RNAP (KRAUSE und KRUPINSKA, 2000).

### 2.21.5 Transkriptionsanalysen in Gegenwart von Cordycepin

Zur Bestimmung einer endonukleolytischen Aktivität von RNA-Polymerasen wurde in Transkriptionsanalysen das ATP-Analogon Cordycepin (Sigma, München) verwendet. Der Einbau dieses Nukleotids resultiert in einem Stoppen der Transkriptelongation, da keine freie Hydroxylgruppe für die weitere Verlängerung der naszierenden RNA zur Verfügung steht. Bei Transkriptionsanalysen in Gegenwart von Cordycepin (3'-Desoxy-ATP, 3'dATP) wurde im Reaktionsansatz eine Nukleotidkonzentration von 2  $\mu\text{M}$  verwendet. 3'dATP wurde entweder vor Beginn der Inkubation oder nach 10 Min. jeweils in einer Endkonzentration von 50  $\mu\text{M}$  hinzugefügt.

## 2.22 Photoaffinitätsmarkierung von RNAP-Untereinheiten

Die Photoaffinitätsmarkierung (PAL: 'photo affinity labelling') dient der Identifizierung an der Transkription beteiligter Proteine (KHANNA *et al.*, 1991). Dabei werden Proteine über den Einbau des modifizierten Nukleotids 4-Thio-UTP (sUTP) und anschließende Bestrahlung mit UV-Licht fest aneinander gebunden. Bei einer gleichzeitigen radioaktiven Markierung der RNA können Proteine identifiziert werden, die während der Transkription mit der neu synthetisierten RNA in Kontakt stehen. Abb. 2 zeigt schematisch die Markierung von Proteinen durch eine Photoaffinitätsmarkierung.

### 2.22.1 Synthese von 4-Thio-UTP

#### Reaktionsansatz:

- 50 mM Tris / HCl pH 7,8
- 10 mM 4-Thio-UDP
- 20 mM ATP
- 5 mM DTT
- 2,5 mM Magnesiumchlorid
- 0,1 mM EDTA
- 1 mM Spermidin
- 5 u Nukleosid-5'-Diphosphat-Kinase

Die Herstellung von 4-Thio-UTP erfolgte nach der Vorschrift von STADE *et al.* (1989).

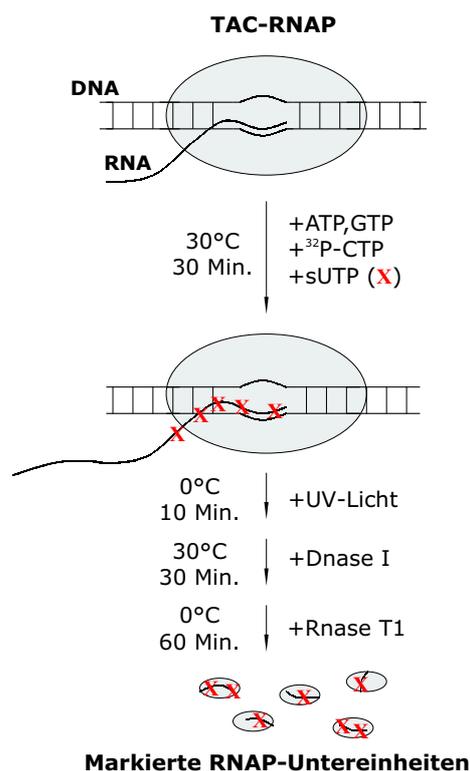


Abb. 2 : Schematische Darstellung zur Markierung von Proteinen durch Photoaffinitätsmarkierung.

Dabei wird ein 100  $\mu$ l Reaktionsansatz innerhalb von 2 Stunden bei 22°C im Dunkeln inkubiert und anschließend EDTA bis zu einer Endkonzentration von 5 mM, SDS zu 0,1 % (w/v) und Proteinkinase K zu 0,1 mg/ml zugesetzt. Nach einer 15minütigen Inkubation bei 37°C wird das Volumen mit 300 mM Natriumacetat, 0,1 % (w/v) SDS auf 500  $\mu$ l aufgefüllt. Nach Extraktion der Nukleotide in 1 Vol. Phenol/Chloroform (1:1) und 1 Vol. Chloroform werden die Nukleotide mit 1 Vol. Aceton/Ethanol (1:1) bei -20°C über Nacht aus der wässrigen Phase gefällt. Das durch eine Zentrifugation (30 Min., 16000xg, 4°C) gewonnene gelbliche Pellet wird mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und in 100  $\mu$ l Wasser gelöst. Die Endkonzentration des sUTP beträgt 10 mM.

### 2.22.2 Durch UV-Licht katalysierte Affinitätsmarkierung von Protein/RNA-Komplexen

2 x TP<sub>A+G</sub> :

60 mM Tris / HCl pH 7,6

20 mM Magnesiumchlorid

je 100  $\mu$ M ATP und GTP

Zur radioaktiven Markierung von Proteinen des TAC-Extrates, die an der Transkription beteiligt sind, wurde folgender Standardansatz nach KRAUSE (1999) verwendet:

37,5  $\mu$ l 2 x TP<sub>A+G</sub>

1  $\mu$ l sUTP (10 mM)

5  $\mu$ l  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-CTP

25-30  $\mu$ l TAC- oder sRNAP-Extrakt

mit Wasser auf 80 ml Gesamtvolumen

2 x TP<sub>A+G</sub>, sUTP,  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-CTP und Wasser wurden unter abgedunkelten Bedingungen gemischt und die Reaktion durch Zugabe des transkriptionsaktiven Extraktes gestartet. Nach einer 30minütigen Inkubationszeit bei 30°C wurden 7  $\mu$ l des Reaktionsansatzes für eine Einbaubestimmung (2.21) abgenommen, während der Rest 5 Min. auf Eis gelagert wurde. Die Probe wurde dann in eine mit TAC-Triton-DOC-Puffer (2.7.3) vorgespülte Tasche einer ELISA-Platte pipettiert und 10 Min. mit einer UV-Lampe (VL-6LM, Vilber Lourmat, Marne La Vall, Frankreich) bei einer Wellenlänge von 312 nm bestrahlt. Die Probe wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Vertiefung der ELISA-Platte mit 50  $\mu$ l TE-Puffer nachgespült. Die Protein/RNA-Komplexe wurden durch Zugabe von 0,1 Vol. 3 M Natriumacetat und 2,5 Vol. Ethanol in einer 30minütigen Inkubation auf Eis gefällt und durch Zentrifugation (30 Min., 16000xg, 4°C) gesammelt. Das Sediment wurde in 40  $\mu$ l TE-Puffer/10 mM MgCl<sub>2</sub> aufgenommen und einem DNase I- (10 u, 30 Min., 25°C) sowie RNase T1-Verdau (25 u, 1 h, 0°C) unterzogen. Die markierten Proteine konnten nun gelelektrophoretisch aufgetrennt werden.

## 2.23 Phosphorylierungsanalysen von TAC-Proteinen

### 5 x Kinasepuffer :

0,5 M Tris / HCl pH 8,0

0,2 M Kaliumchlorid

25 mM Magnesiumchlorid

10 mM Calciumchlorid

2,5 mM DTT

2mM EDTA

### 100 $\mu$ l Standard - Phosphorylierungsansatz :

30  $\mu$ l TAC - Extrakt

20  $\mu$ l 5 x Kinasepuffer

4  $\mu$ l  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP (3000 Ci/mmol)

(10  $\mu$ l Protein-Kinase A (5 u/ $\mu$ l))

mit Wasser auf 100  $\mu$ l Gesamtvolumen

Zur Untersuchung, ob einzelne Proteine des TAC-Komplexes phosphoryliert werden können und ob eine endogene Kinase in TAC-Extrakten vorhanden ist, wurden TAC-Proteine mit radioaktiv markiertem  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP markiert. 30  $\mu$ l TAC-Extrakt wurden in einem Standard-Transkriptionsansatz nach BAGINSKY *et al.* (1997) mit Kinasepuffer und  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP versetzt. Dabei wurden zwei verschiedene Ansätze gewählt. Zum einen wurde dem TAC-Extrakt neben dem Reaktionspuffer zur Untersuchung einer Autophosphorylierungskapazität lediglich das radioaktiv markierte  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP zugesetzt, zum anderen noch zusätzlich eine exogene Proteinkinase (PKA). Die Reaktion wurde für 30 Min. bei 30°C durchgeführt und die Proteine anschließend durch Chloroform/Methanol-Extraktion (2.16.4) von Nukleinsäuren befreit. Der Nachweis phosphorylierter Proteine erfolgte nach Auftrennung in SDS-Polyacrylamidgelen (2.17.1) und Trocknung der Gele durch Exposition auf einem Röntgenfilm (2.15.5).

## 2.24 Sequenzierung von TAC-Proteinen

Die Sequenzierung von TAC-Proteinen erfolgte zum einen in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. R. Oelmüller in Jena, zum anderen wurden Proteine aus einem eindimensionalen, mit

Coomassie gefärbten SDS-Polyacrylamidgel (2.18.1) in Kooperation mit Dr. H.-P. Mock am IPK Gatersleben analysiert.

Die Sequenzierung von Proteinen in Jena erfolgte wie bei PFALZ (2004) beschrieben. Nach einer Phenolextraktion von einer 5  $\mu\text{g}$  Protein entsprechenden Menge TAC-Extrakt aus Spinatchloroplasten (2.7.3) und Fällung der Proteine aus der organischen Phase mit 4 Vol. Ethanol bei  $-20^{\circ}\text{C}$  über Nacht wurde das Sediment zweimal mit Ethanol gewaschen. Die Proteine wurden in 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat mit 0,05 % (v/v)  $\beta$ -Dodecylmaltoosid resuspendiert und nach einer 10minütigen Denaturierung bei  $95^{\circ}\text{C}$  nach Angaben des Herstellers (Promega, Mannheim) tryptisch verdaut. Das Peptidgemisch wurde anschließend über eine mit POROS-R2 (Applied Biosystems, Foster City, USA) überschichteten C18 Zip-Tip Säule (Millipore, Eschborn) aufgereinigt, und es wurden Massenspektren an einem LCQ Deca XP IONTRAP-Massenspektrometer (Thermo, San Jose, USA) mit einer vorgeschalteten Nano-HPLC-Anlage (Dionex, Idstein) nach STAUBER *et al.* (2003) aufgenommen. Die Analyse der massenspektrometrischen Daten erfolgte über den Vergleich mit der TAIR-Datenbank von *Arabidopsis thaliana* ([www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org)).

Für die Analysen am IPK Gatersleben wurden ca. 10  $\mu\text{g}$  Protein eines TAC II-Extraktes aus Gerste gelelektrophoretisch aufgetrennt und das SDS-Polyacrylamidgel mit Coomassie (2.18.1) angefärbt. Insgesamt wurden aus 18 Banden Gelstücke ausgeschnitten. Diese wurden mit 10 % (w/v) Ammoniumbicarbonat / 50 % (v/v) Acetonitril gewaschen und anschließend getrocknet. Nach einem Verdau mit 10  $\mu\text{l}$  Trypsin (10 ng/ $\mu\text{l}$  in 5 mM Ammoniumbicarbonat / 5 % (v/v) Acetonitril) über 5 Std. bei  $37^{\circ}\text{C}$  wurden Massenspektren der Proben aufgezeichnet und diese durch Vergleich mit den verfügbaren Datenbankeinträgen für Gerste analysiert.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Aufreinigung von 'Transkriptionsaktiven Chromosomen'

Die Aufreinigung von TAC-Extrakten erfolgte ausgehend von Thylakoidmembranen aus Chloroplasten. Die Plastiden-DNA und damit auch die TAC-Komplexe sind in differenzierten Chloroplasten mit dieser Membranen assoziiert (KUROIWA, 1991). Nach Solubilisierung der Membranen erfolgte eine Protaminsulfatfällung (2.8.1), und die sedimentierten DNA/Protein-Komplexe wurden anschließend über eine Gelfiltration von weiteren Plastidenbestandteilen, wie z.B. Chlorophyll, abgetrennt. Aufgrund der an der TAC-RNAP anhängenden ptDNA resultiert ein Molekulargewicht von über 2000 kD. Daher eluiert diese Fraktion im Ausschlußvolumen der Sepharosesäule, während andere Bestandteile die Gelmatrix langsamer passieren. Die TAC enthaltenden Fraktionen konnten über ihren hohen DNA- und Proteingehalt oder ihre von exogener DNA unabhängigen Transkriptionsaktivität nachgewiesen werden. Abb. 3A zeigt die Verteilung von DNA und Proteinen im Säuleneulat, die anhand der Extinktion der Fraktionen bei Wellenlängen von 260 nm (DNA) und 280 nm (Proteine) bestimmt wurde. Die Transkriptionsaktivität (Abb. 3B) korreliert mit den erhaltenen Maxima der photometrischen Messungen. Die nach dieser ersten Gelfiltration erhaltenen TAC-Fraktionen wurden vereinigt und zum Zwecke der Entfernung der zuvor verwendeten Detergenzien Triton X-100 und Natrium-Deoxycholat einer weiteren Fällung und Gelfiltration unterzogen (2.8.4). Zur Vermeidung proteolytischer Aktivität wurde den TAC-Fraktionen im Zuge dieser Aufreinigung noch ein Proteinase-Inhibitor hinzugefügt. Dies hatte zur Folge, daß eine Detektion der TAC-Fraktionen nach der zweiten Gelfiltration nicht mehr über eine Proteinbestimmung möglich war. Die TAC-Fraktionen konnten nur noch über ihre Transkriptionsaktivität oder den DNA-Gehalt bestimmt werden. Eine alternative Methode zur Bestimmung der TAC-Fraktionen im Säuleneulat war daher der Nachweis der ptDNA über Agarosegelelektrophorese (2.12.2). Abb. 4 zeigt die Verteilung der ptDNA in den gesammelten Fraktionen nach der zweiten Gelfiltration. Die DNA-haltigen Fraktionen wurden anschließend durch Ultrazentrifugation ankonzentriert, das Sediment wurde in geringem Volumen an Puffer aufgenommen und konnte bis zur weiteren Verwendung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert werden (2.8.4).

Die vereinigten TAC-Fraktionen der ersten Gelfiltration werden im folgenden immer als

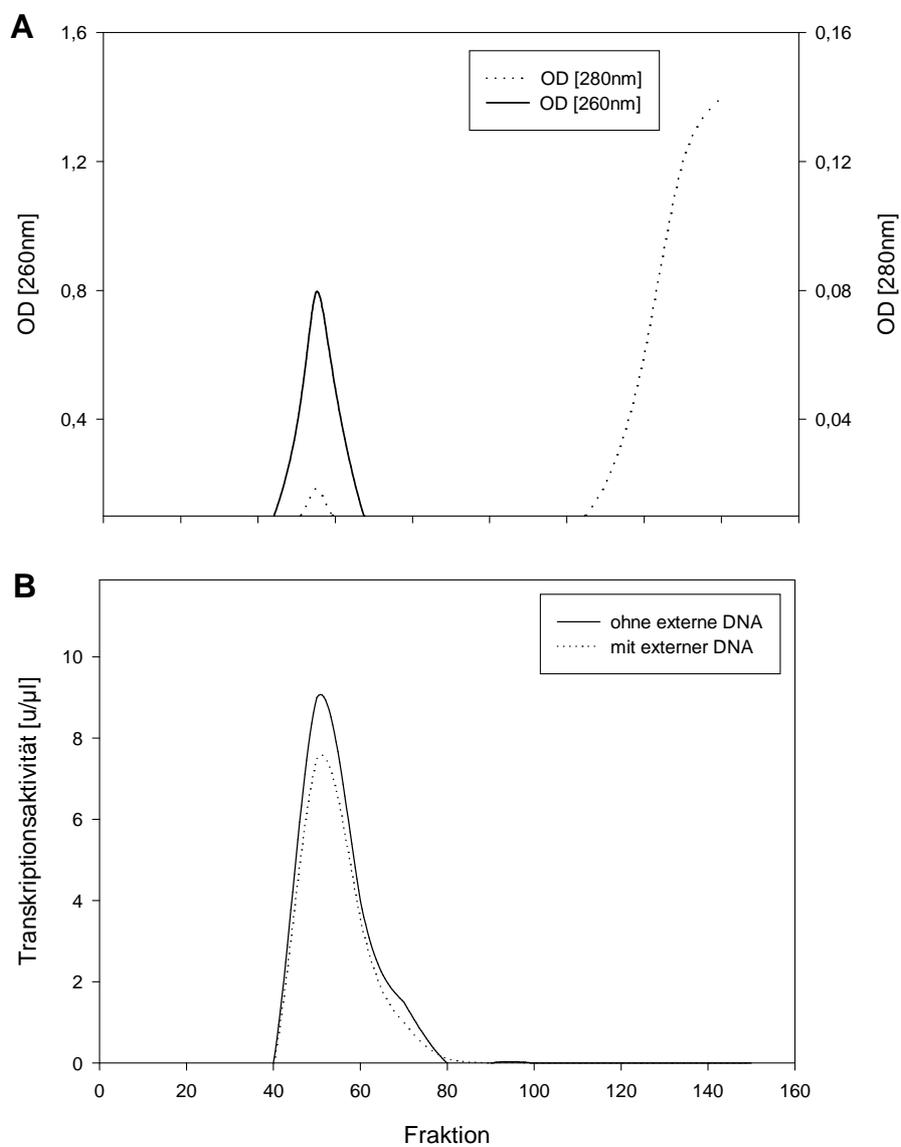
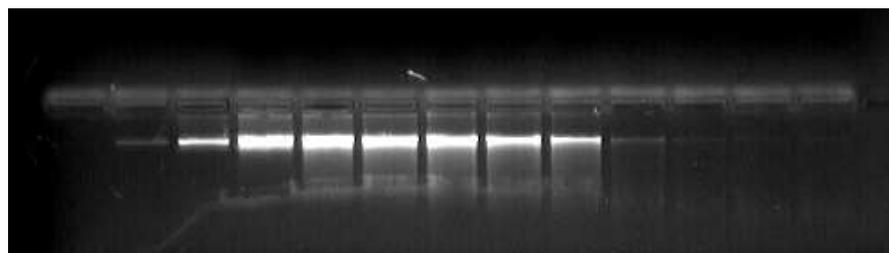


Abb. 3 : Elutionsprofil der 1. Gelfiltration bei der TAC-Isolierung. Die nach Solubilisierung der Plastiden-Membranfraktion angereicherten DNA/Protein-Komplexe wurden nach Auftragen auf eine Sepharose-Säule in Fraktionen à 500 Tropfen (ca. 6,5 ml) gesammelt. (A) Der DNA- und Proteingehalt wurde von jeder fünften Fraktion bei Wellenlängen von 260 nm bzw. 280 nm photometrisch bestimmt. (B) Transkriptionsaktivität der Fraktionen mit und ohne Zugabe exogener Kalbsthymus-DNA (2.21). Chlorophyllhaltige Extrakte eluierten ca. ab Fraktion 120.



**Fr.** 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26 28 30 32

Abb. 4 : Agarosegel zur Bestimmung des DNA-Gehaltes der Fraktionen nach der 2. Gelfiltration. Nach Entfernung der Detergenzien aus TAC-Extrakten wurden diese erneut über eine Sepharose-Säule gegeben und Fraktionen à 20 Tropfen (ca. 500  $\mu$ l) gesammelt. Von jeder 2. Fraktion (Fr.) wurden 13,5  $\mu$ l mit 1,5  $\mu$ l DNA-Auftragspuffer (50 % (v/v) Glycerin, 0,02 % (w/v) Bromphenolblau) versetzt und auf einem ethidiumbromidhaltigen Agarosegel analysiert. Die DNA-haltigen Fraktionen (hier 12-24) wurden über eine Ultrazentrifugation ankonzentriert.

TAC I, die nach einer zweiten Gelfiltration und anschließender Ultrazentrifugation stark angereicherten Extrakte als TAC II bezeichnet. Wird direkt auf die Transkriptionsaktivität von TAC-Extrakten oder die im TAC befindlichen RNAPs bezug genommen, wird der Begriff TAC-RNAP verwendet.

### 3.1.1 Proteinzusammensetzung von TAC-Extrakten

Transkriptionsaktive Chromosomen bestehen aus plastidärer DNA, aus bereits *in vivo* initiierten Transkripten und einer Vielzahl von Proteinen. Die Gesamtzahl aller vorhandenen Proteine kann nur geschätzt werden und liegt bei über 40. Es wurden die Proteinmuster von TAC-Extrakten aus Spinat, Mais und Gerste untersucht (Abb. 5). Die Proteinzusammensetzung der TAC-Extrakte aus den drei Pflanzen unterscheidet sich nur geringfügig, sowohl im Hinblick auf die Anzahl der Proteine als auch auf deren Verteilung in den TAC-Fraktionen der untersuchten Pflanzen. Es ist zu vermuten, daß ein ähnliches Proteinmuster auch bei anderen Arten erhalten werden kann. Die TAC-Extrakte der untersuchten Pflanzen unterscheiden sich geringfügig im Bereich von 35-50 kD. Bei TAC-Extrakten einzelner Pflanzen sind einige zusätzliche Proteine enthalten, die in denen der anderen Pflanzen nicht nachweisbar sind. So sind in Gerste stärker angereicherte Proteine bei ca. 22 kD, 28-30 kD und 58 kD vorhanden sowie in Spinat bei 18 kD und 50-52 kD. Die hohe Übereinstimmung der Proteinmuster zeigt, daß die verwendete TAC-Präparation universell anwendbar ist

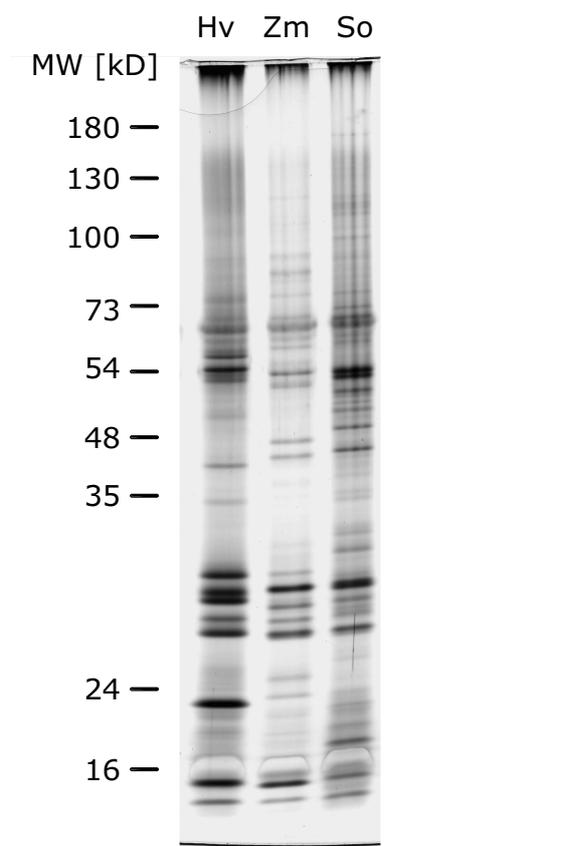


Abb. 5 : Vergleich der Proteinzusammensetzung von TAC II-Extrakten aus Gerste (Hv), Mais (Zm) und Spinat (So). Jeweils 2  $\mu\text{g}$  Protein wurden nach Chloroform/Methanol-Extraktion in einem 7,5-15%igen SDS-Polyacrylamid-Gradientengel aufgetrennt und mittels Silberfärbung sichtbar gemacht.

und mit dieser Methode einheitliche Fraktionen gewonnen werden können, deren Zusammensetzung relativ unabhängig von der bearbeiteten Pflanze ist.

### 3.1.2 Aufreinigung von Chloroplasten in Anwesenheit von Natriumchlorid

Ein Ziel dieser Arbeit war die Verbesserung der Aufreinigungsmethode und die Identifizierung einzelner Proteine der TAC-RNAP. Durch eine Verkleinerung der Maschengröße der Filtrationsnetze bei der Isolierung von Thylakoidmembranen konnte keine entscheidende Reduzierung der Kontamination durch andere Kompartimente erreicht werden (MÜLLER, 2000). Bei der Aufreinigung von Plastiden aus Kartoffeln wurde festgestellt, daß bei einer erhöhten Salzkonzentration offenbar weniger Kontaminationen der Plastidenfraktionen auftreten (BOOKJANS *et al.*, 1984). Daher wurde dem Aufschlußpuffer bei der Chloroplasten-

isolierung (2.7.1) zusätzlich 0,5 M Natriumchlorid zugesetzt. Die Proteinzusammensetzung von TAC I-Extrakten, die nach der herkömmlichen Methode und unter Verwendung von Natriumchlorid erhalten wurden, wies einige Unterschiede auf. Es wurde aber keine Verringerung der Proteinanzahl durch die Verwendung eines modifizierten Puffers festgestellt (Abb. 6). Die Kontamination durch nicht-plastidäre Proteine, die bei der Präparation an die Chloroplastenmembranen bzw. bei der weiteren Aufreinigung an die ptDNA binden, wie z.B. Histone (SUCK, 1996; KRAUSE, 1999; PFALZ, 2004), wird offenbar nicht reduziert. Für alle in dieser Arbeit bearbeiteten TAC-Extrakte wurde daher weiterhin das ursprüngliche Protokoll verwendet.

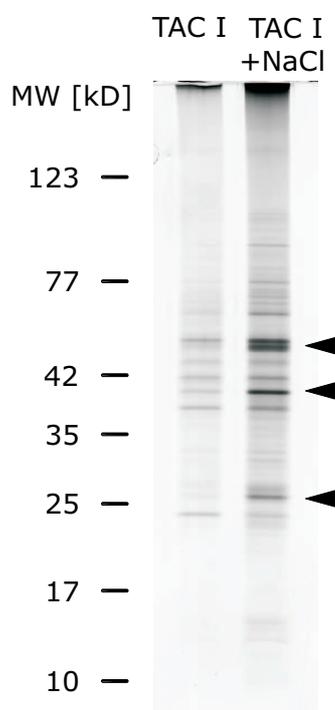


Abb. 6 : Proteinzusammensetzung von TAC-Extrakten aus Spinat mit und ohne Verwendung von Natriumchlorid bei der Plastidenisolierung. Jeweils 2  $\mu$ g Protein wurden in einem 10-15%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mittels Silberfärbung sichtbar gemacht. Unterschiede im Proteinstreifenmuster sind durch Pfeile angedeutet.

### 3.1.3 Extraktion von TAC-Proteinen

Ein wichtiger Schritt bei der Analyse von TAC-Komplexen ist die Extraktion der Proteine vor einer gelelektrophoretischen Auftrennung zur Anfärbung oder Übertragung auf Membranen für die Immundetektion. Eine Fällung mit TCA, wie sie häufig angewendet wird, ist

zum einen bei derart kleinen Proteinmengen nicht sinnvoll, zum anderen fällt das verwendete Triton X-100 in TAC I-Fractionen aus und bildet zusammen mit den Proteinen ein voluminöses viskoses Sediment. Die Proteine isolierter TAC-Extrakte können nicht ohne eine Fällung und Befreiung von der ptDNA in Proteingelen aufgetrennt werden, da der Komplex aufgrund seines Molekulargewichts von über 2000 kD und seiner außerordentlichen Stabilität die Gelmatrix nicht passieren kann. Außerdem werden die noch vorhandenen Nucleinsäuren bei einer Silberfärbung ebenfalls angefärbt und verursachen einen starken Hintergrund. Bislang wurde eine Entfernung der ptDNA über eine Extraktion mit Phenol (2.16.3) erzielt (KRAUSE, 1999). In dieser Arbeit wurde die ursprünglich von WESSEL und FLÜGGE (1984) beschriebene Methode zur Proteinfällung mit Chloroform und Methanol getestet. Bei dieser Proteinextraktion, die zu einer Abreicherung von Detergenzien, wie sie auch in TAC I-Extrakten vorliegen, und Lipiden aus Proteingemischen Einsatz fand, kommt es zu einer Trennung in eine wässrige und eine organische Phase, wie dies auch bei der Phenolextraktion der Fall ist. Es wurden jeweils eine 2  $\mu$ g Protein entsprechende Menge an TAC-Extrakten aus Spinat einer Fällung unterzogen und gelelektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 7). Es konnte gezeigt werden, daß beide Fällungsmethoden für TAC-Präparationen einsetzbar sind und nicht zu Änderungen der Proteinzusammensetzung führen. Im Vergleich zu der phenolischen Extraktion wird mit der Chloroform/Methanol-Extraktion jedoch eine höhere Ausbeute an Proteinen erreicht, wie die stärkere Anfärbung der Proteine deutlich zeigt. Bei einer längeren Färbung werden im silbergefärbten Gel (A) noch weitere Proteine in der phenolextrahierten Probe sichtbar. Entsprechende Ergebnisse wurden auch mit größeren Mengen aufgetrennter TAC-Proteine erhalten, die im Gel nicht mit Silbernitrat, sondern mit Coomassie-Brillantblau angefärbt wurden (B) oder durch Fluoreszenzmarkierung und anschließende zweidimensionale Gelelektrophorese sichtbar gemacht wurden (3.2.4). Die schwächere Färbung von Proteinen nach der Phenolextraktion ist auf einen sehr starken Verlust an Proteinen durch diese Art der Fällung zurückzuführen.

Die neue Extraktionsmethode stellt eine entscheidende Verbesserung dar. Der geringe Verlust von Proteinen durch diese Fällung ist ein bedeutender Vorteil, vor allem da zu bedenken ist, daß aus ca. 1 kg Blattmaterial nur etwa 10-15  $\mu$ g Protein (TAC II) gewonnen werden können. Ein weiterer Vorteil ist der geringere Zeitaufwand dieser Proteinfällung. Statt einer Probenvorbereitungszeit von etwa zwei Stunden vor einer Gelelektrophorese werden für

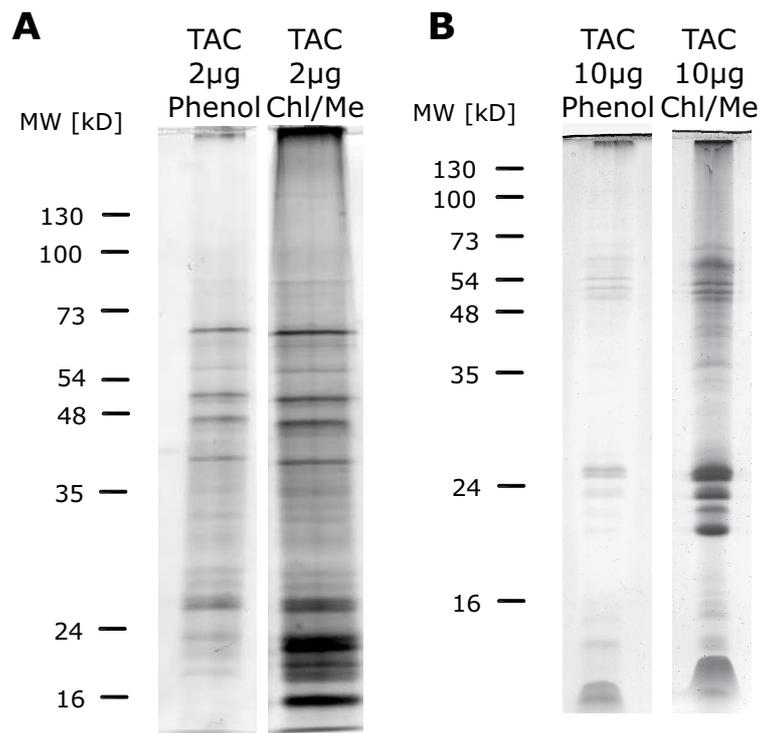


Abb. 7 : Quantitativer Vergleich verschiedener Proteinfällungen. Jeweils 2 µg TAC I-Proteine aus Spinat wurden mit Phenol (2.16.3) oder Chloroform/Methanol (2.16.4) gefällt, in einem 12%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und die Proteine anschließend über eine Silberfärbung sichtbar gemacht (A). 10 µg TAC II-Proteine aus Gerste wurden ebenfalls mit zwei verschiedenen Methoden gefällt, in einem 10-15%igen SDS-Polyacrylamid-Graientengel aufgetrennt und mit Coomassie-Brillantblau (2.18.1) angefärbt (B).

die Chloroform/Methanol-Extraktion maximal 20 Min. benötigt. Bei beiden Methoden liegen die Proteine nach der Fällung bereits denaturiert vor. Die routinemäßig durchgeführte Denaturierung der Probe durch eine Inkubation in Probenpuffer bei 95°C (2.17.1) hatte keinen Einfluß auf die Auftrennung und Proteinzusammensetzung (nicht gezeigt), wurde aber bei allen Experimenten durchgeführt.

## 3.2 Charakterisierung von 'Transkriptionsaktiven Chromosomen'

### 3.2.1 Transkriptionaktivität der TAC-RNAP

Neben dem Proteinmuster wurden die Transkriptionsraten der TAC-Extrakte aus Spinat, Mais und Gerste bestimmt. Sie diente als Maß für die Effizienz der Reinigungsschritte und die daraus resultierende Ankonzentrierung der RNAP-Aktivität. Tab. 3 zeigt

die Transkriptionsraten verschiedener TAC-Extrakte. TAC I enthält die vereinigten transkriptionsaktiven Fraktionen nach der ersten Gelfiltration. TAC II stellt eine stark angereicherte Fraktion dar und wurde ausgehend von TAC I über eine Protaminsulfatfällung, eine zweite Gelfiltration sowie anschließende Ultrazentrifugation gewonnen (2.8.4).

*Tab. 3* : Transkriptionsraten verschiedener TAC-Extrakte. Eine Enzymeinheit (u) entspricht einem Einbau von 1 fmol  $\alpha$ - $^{32}$ P-CTP in RNA während einer 30minütigen Inkubation bei 30°C (FALK, 1994).

Pflanze	Aktivität TAC I [u/ $\mu$ g Protein]	Aktivität TAC II [u/ $\mu$ g Protein]
Spinat	3550	10400
Mais	3200	9000
Gerste	700	5600

Da die TAC-Präparation für Spinat optimiert wurde (KRAUSE, 1999), konnte erwartungsgemäß in dieser Pflanze die stärkste Anreicherung der Transkriptionsaktivität gemessen werden. Bei Extrakten aus Gerste ist die Transkriptionsaktivität von TAC I am geringsten. Dies kann darauf zurückzuführen sein, daß durch die dickere Wachsschicht auf den Gerstenblättern bereits bei der Chloroplastenisolierung im Vergleich zu Mais und Spinat eine schwächere Ausbeute an intakten Plastiden erzielt wurde. Durch die Ankonzentrierung transkriptionsaktiver Komplexe aus dem Säuleneluat durch eine 2. Gelfiltration und Ultrazentrifugation konnte die Aktivität von TAC II-Extrakten aus Gerste aber wieder auf über 50% im Vergleich zu Spinat-Extrakten angereichert werden. Für Mais ist die verwendete Präparation fast ebenso gut geeignet wie für Spinat.

### 3.2.2 Einfluß von Transkriptionshemmstoffen auf die TAC-RNAP

Eine entscheidende Frage im Zusammenhang mit der Transkriptionsaktivität der TAC-RNAP ist, welche RNA-Polymerasen für die Transkriptionsaktivität verantwortlich sind. Die PEP konnte zweifelsfrei über die Immundetektion einzelner Untereinheiten in TAC-Extrakten nachgewiesen werden (SUCK, 1996; KRAUSE und KRUPINSKA, 2000). Da PEP-defiziente Pflanzen aber prinzipiell in der Lage sind, das gesamte Plastom zu transkribieren

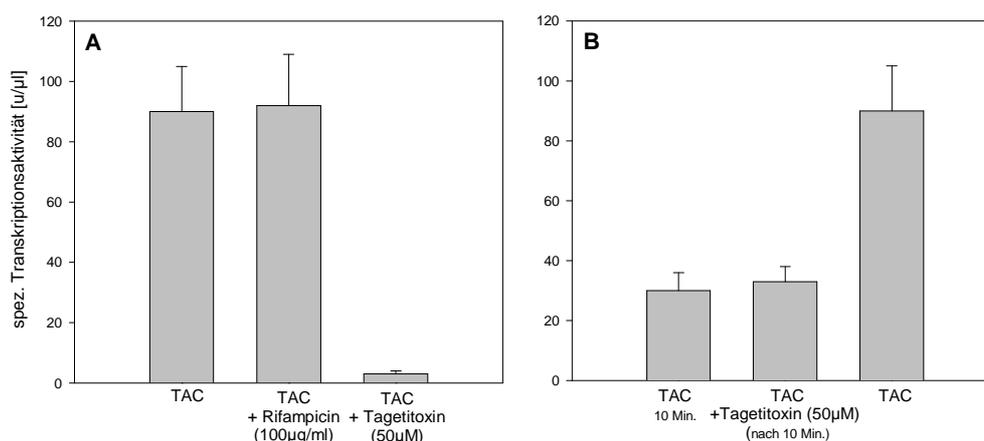


Abb. 8 : Transkriptionsaktivität von TAC-Extrakten in Gegenwart der Transkriptionshemmstoffe Rifampicin und Tagetitoxin. Die Transkriptionsrate wurde soweit nicht anders vermerkt nach einer 30minütigen Inkubation bei 30°C bestimmt (2.21). Dabei wurden die Hemmstoffe vor Beginn der Inkubation (A) oder im Fall von Tagetitoxin erst nach 10 Min. dem Transkriptionsansatz hinzugefügt und der Ansatz weitere 20 Min. inkubiert (B). Es wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen anhand von drei unabhängigen Experimenten ermittelt.

(FALK *et al.*, 1993; KRAUSE, 1999; LEGEN *et al.*, 2002), ist anzunehmen, daß auch NEPs im Komplex vorliegen. Es gibt diverse Hemmstoffe, die spezifisch RNAPs hemmen können und es ist anzunehmen, daß auch eine selektive Hemmung von RNAPs im TAC möglich ist. Rifampicin hemmt die bakterielle Transkription. Tagetitoxin inhibiert verschiedene RNAPs, darunter auch die PEP (BERENDS-SEXTON *et al.*, 1990), während die Transkription einer NEP vom Phagentyp offenbar unbeeinflusst bleibt (LIERE und MALIGA, 1999). Die durchgeführten Transkriptionsanalysen bestätigten die Ergebnisse von KRAUSE (1999), daß die TAC-RNAP durch Rifampicin als Hemmstoff der Initiation nicht beeinflusst wird (Abb. 8). Damit kann ausgeschlossen werden, daß eine Neuintiation durch die PEP stattfindet. Die TAC-RNAP wird ebenfalls durch Tagetitoxin gehemmt. Unabhängig davon, ob Tagetitoxin dem Transkriptionsansatz vor Beginn der Inkubation (A) oder nach 10 Min. hinzugegeben wurde (B), findet eine sofortige und fast vollständige Hemmung der Transkription statt, was zunächst einmal darauf hindeutet, daß im TAC keine NEP vom Phagentyp vorliegt. Es ist aber anzumerken, daß es keine Daten gibt, die den genauen Mechanismus der Hemmung von RNAPs durch Tagetitoxin aufzeigen. So werden auch die eukaryotische RNAP II im Zellkern durch hohe Konzentrationen ( $\gg 100 \mu\text{M}$ , MATHEWS und DURBIN (1990))

und ebenso bei weitaus geringeren Konzentration von unter  $10 \mu\text{M}$  die RNAP III gehemmt (STEINBERG *et al.*, 1990). In einem Kontrollexperiment wurde gezeigt, daß Tagetitoxin auch die T7-Phagen-RNAP hemmt (Abb. 9). Daher ist der gleiche Effekt auch bei NEPs

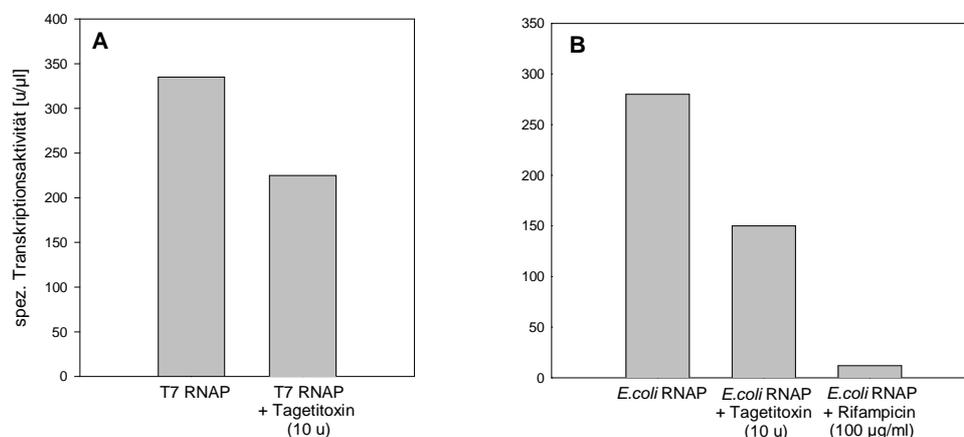


Abb. 9 : Transkriptionsaktivität von RNA-Polymerasen in Gegenwart von Transkriptionshemmstoffen. Die Transkriptionsrate von jeweils 10 u einer T7-RNAP (A) und der *E. coli* RNAP (B) wurden nach 30minütiger Inkubation bei  $30^{\circ}\text{C}$  mit und ohne Zugabe von Transkriptionshemmstoffen bestimmt. Es wurden 10 u Tagetitoxin sowie Rifampicin in einer Konzentration von  $100 \mu\text{g/ml}$  eingesetzt. Es wurden die Mittelwerte anhand von drei unabhängigen Experimenten ermittelt.

in Plastiden, die Ähnlichkeiten zu den Phagen-RNAPs aufweisen, zu erwarten. Die eukaryotische *E. coli* RNAP wird bekannterweise von den beiden Hemmstoffen Tagetitoxin und Rifampicin gehemmt. 1 u Tagetitoxin inhibiert definitionsgemäß 0,5 u *E. coli*-RNAP-Aktivität. Da jeweils 10 u *E. coli*-RNAP und Tagetitoxin eingesetzt wurden, liegt hier die Hemmung bei 50 %. Die Aktivität der T7-RNAP wird zu etwa 30 % gehemmt. Dies ist überraschend, denn LIERE und MALIGA (1999) konnten bei ähnlichen Konzentrationen keine Hemmung der Aktivität einer T7-Phagen-RNAP durch Tagetitoxin feststellen. Diese Experimente zeigen, daß eine NEP-Aktivität im TAC aufgrund ihrer Empfindlichkeit gegenüber Transkriptionshemmstoffen nicht ausgeschlossen werden kann, ein endgültiger Nachweis für die Existenz der NEP im TAC steht aber weiterhin aus. Der Einsatz von Tagetitoxin als ein Hemmstoff, der die NEP unbeeinflusst läßt und als negativer 'Marker' für eine NEP-Aktivität herangezogen wird, ist jedoch fraglich.

### 3.2.3 Phosphorylierungsanalysen mit TAC-Extrakten

Die Transkriptionsaktivität in Plastiden scheint teilweise von der Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren abhängig zu sein. So konnte gezeigt werden, das eine sRNAP-Fraktion aus Erbse über eine 'plastidäre Transkriptionskinase' (PTK) verfügt (TILLER und LINK, 1993; BAGINSKY *et al.*, 1997, 1999), die die Transkriptionsaktivität beeinflusst. SUCK (1996) und KRAUSE (1999) konnten zeigen, daß TAC-Extrakte offenbar auch über eine endogene Proteinkinase verfügen.

Eine interessante Frage im Zusammenhang mit den Proteinen im TAC ist, ob und welche Proteine phosphoryliert werden können und ob die Phosphorylierbarkeit auch mit der Transkriptionsaktivität zusammenhängt. Um diese Frage zu beantworten, wurden Phosphorylierungsanalysen mit TAC-Extrakten aus verschiedenen Pflanzen durchgeführt. Es wurden zwei unterschiedliche Versuchsansätze gewählt. Zum einen wurde dem TAC-Extrakt neben einem Reaktionspuffer lediglich radioaktiv markiertes  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP zugesetzt, zum anderen zusätzlich eine exogene Proteinkinase (PKA, 2.23). In sämtlichen TAC-Extrakten wurden ohne Zugabe der Proteinkinase keine Signale detektiert (Abb. 10). Offenbar fand keine Autophosphorylierung statt. Wird dem Reaktionsansatz PKA hinzugefügt, zeigte sich für alle TAC-Präparationen ein ähnliches Phosphorylierungsmuster. Es wurden jeweils zwei Proteine bei 52-55 kD deutlich markiert, sowie einzelne Proteine bei 15, 35 und 75 kD. Auffällig ist eine starke zusätzliche Markierung bei 25 kD, die ausschließlich in einer TAC-Fraktion aus Spinat auftritt (Spur 2). Des weiteren sind im Maisextrakt (Wildtyp, Spur 8) weitere Banden im niedermolekularen Bereich erkennbar.

Die Tatsache, daß keine Autophosphorylierung stattfindet, steht zwar im Widerspruch zu vorangegangenen Ergebnissen (KRAUSE, 1999), zeigt aber, daß eine eventuell vorhandene endogene Proteinkinase nicht notwendigerweise im TAC enthalten sein muß. Ob eine über Kinasen katalysierte Phosphorylierung von Proteinen eine Auswirkung auf die Transkriptionskapazität der TAC-RNAP und die Genspezifität hat, wurde nicht untersucht.

### 3.2.4 Zweidimensionale Auftrennung von TAC-Proteinen

Die Etablierung einer verbesserten Proteinextraktion war Voraussetzung für eine verbesserte immunologische Detektion einzelner Proteine und machte die Identifizierung weiterer Proteine möglich. Eine deutlich höhere Auflösung zur Analyse der Proteinzusam-

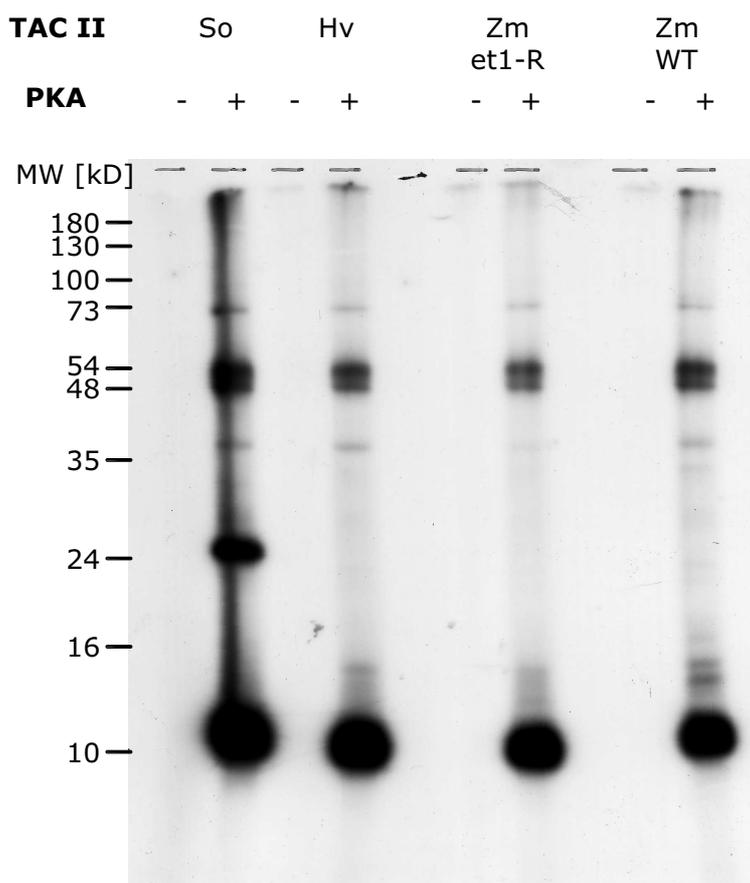
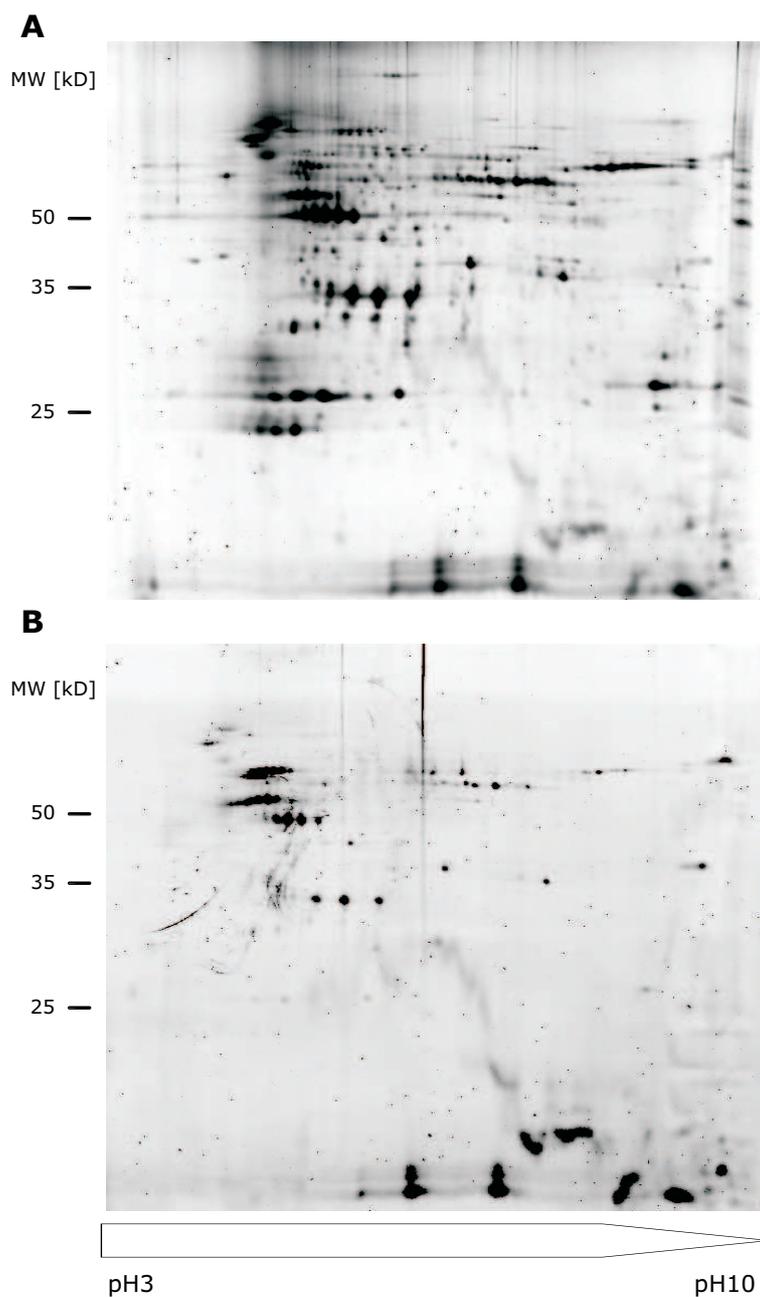


Abb. 10 : Phosphorylierungsmuster von TAC II-Extrakten mit (+) und ohne Zugabe (-) einer exogenen Proteinkinase (PKA). Jeweils 2  $\mu\text{g}$  TAC II aus Spinat (So), Gerste (Hv) und Mais (Zm, Wildtyp bzw. ET1-defiziente Linie et1-R, 3.3) wurden für 30 Minuten bei 30°C in Anwesenheit von  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP inkubiert (2.23), die Proteine anschließend über Chloroform/Methanol-Extraktion gefällt (2.16.4) und auf einem 7,5-15%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Das Gel wurde getrocknet und für 15 Minuten auf einem Röntgenfilm exponiert.

mensetzung von TAC-Komplexen bietet die zweidimensionale Gelelektrophorese. Bei der zweidimensionalen Auftrennung von Proteinen werden diese zuerst über eine isoelektrische Fokussierung aufgrund ihres isoelektrischen Punktes und anschließend über SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt (2.17.3). Eine derartige Analyse von TAC-Proteinen lieferte genauere Informationen, über die Zahl der tatsächlich mit dem TAC assoziierten Proteine (Abb. 11). Die Detektion der TAC-Proteine erfolgte außerdem durch eine hochsensitive Fluoreszenzmarkierung mit Cy3 (2.17.3). Die Auswertung des Proteinmusters nach zweidimensionaler Trennung zeigte, daß im TAC statt der bislang angenommenen 40 Proteine mindestens 80-100 Proteine vorliegen. Die



*Abb. 11* : Zweidimensionale Auftrennung von TAC-Proteinen aus Spinat durch isoelektrische Fokussierung (IEF) und anschließende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese. Jeweils 5  $\mu\text{g}$  Protein wurden durch Chloroform/Methanolextraktion (A, 2.16.4) oder Phenolextraktion (B, 2.16.3) gefällt. Die Proteine wurden vor der Auftrennung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3 markiert (2.17.3). Die IEF wurde im pH-Bereich von 3-10 (nichtlinear) durchgeführt, die anschließende Auftrennung nach dem Molekulargewicht in einem 12%igen SDS-Polyacrylamidgel.

meisten Proteine sind bei einem isoelektrischen Punkt von etwa 6-8 zu finden. Prominente Proteinbanden in eindimensionalen Gelen stellen meist nicht nur ein Protein dar. Oft sind

bei dem gleichen Molekulargewicht mehrere Proteine vorhanden, wobei es sich auch um unterschiedliche Modifizierungen desselben Proteins handeln könnte, z.B. unterschiedlich phosphorylierte Proteine. Interessant sind einzelne Proteine im basischen Bereich, bei denen es sich um nukleinsäurebindende Proteine handeln könnte. Für eine Identifizierung der einzelnen Proteine über Massenspektrometrie reichte die eingesetzte Proteinmenge jedoch nicht aus.

Der Vergleich der Proteinmuster, die aufgrund zweier unterschiedlicher Fällungsmethoden erhalten wurden, bestätigte die Ergebnisse vorangegangener Experimente nach eindimensionaler Proteinauftrennung (3.1.3). Die beiden Fällungsmethoden lieferten unterschiedliche Proteinmuster. Durch eine Phenolextraktion (B) geht offenbar eine größere Proteinmenge verloren als dies bei einer Extraktion mit Chloroform und Methanol der Fall ist (A).

### 3.2.5 Sequenzierung von TAC-Proteinen

Das vorrangige Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung und anschließende Charakterisierung von Proteinen im TAC-Komplex. Selbst von Proteinen, die in sehr geringer Menge vorliegen, können bereits Sequenzdaten erhalten werden. Neben dem immunologischen Nachweis von Proteinen (3.2.6) wurde versucht, TAC-Proteine in SDS-Polyacrylamidgelen aufzutrennen, aus der Gelmatrix herauszulösen und anschließend zu sequenzieren. Für diesen Ansatz wurde als Versuchspflanze Gerste gewählt, da für Spinat und Mais in den Datenbanken keine so umfangreichen Sequenzdaten vorliegen. In Zusammenarbeit mit Dr. H.-P. Mock vom IPK Gatersleben konnte eine Sequenzierung von TAC-Proteinen durchgeführt werden. Am IPK stehen zusätzlich zu den öffentlich zugänglichen Datenbanken noch weitere interne EST-Datenbanken zur Verfügung, und die exprimierten Gene von Gerste sind zu schätzungsweise 70-80% durch EST-Sequenzen abgedeckt.

Für die Sequenzanalyse wurde ein 7,5-15%iges SDS-Polyacrylamid-Gradientengel mit ca. 10  $\mu$ g Protein beladen und anschließend mit Coomassie gefärbt (Abb. 12). Aus den gefärbten Banden wurden einzelne Proteinbanden am IPK Gatersleben ausgeschnitten und nach tryptischem Verdau einzelne Peptide über ihre Massen mittels MALDI-TOF bestimmt. Von insgesamt 18 Proben konnten allerdings nur für drei Proteine relevante Sequenzdaten ermittelt werden. Dabei handelte es sich um zwei Untereinheiten der ATP-Synthase (1,2),

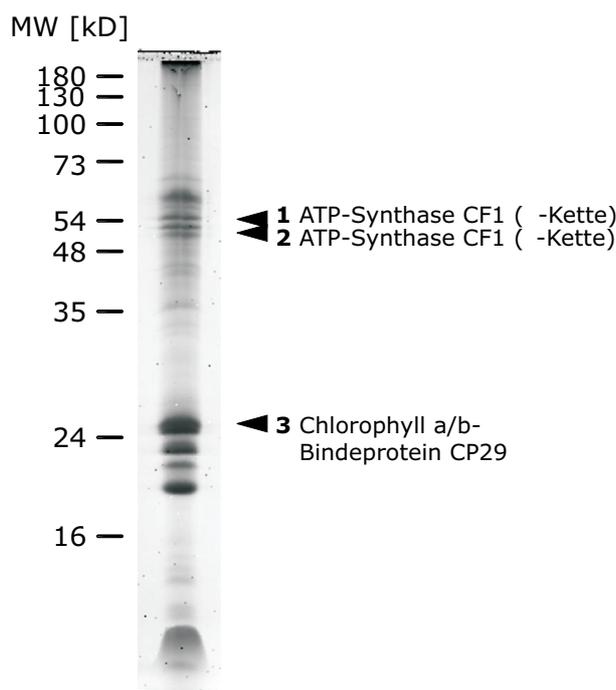


Abb. 12 : 10  $\mu\text{g}$  TAC II-Proteine aus Gerste wurden mittels Chloroform/Methanol-Extraktion gefällt, auf einem 7,5-15%igen SDS-Polyacrylamidgradientengel aufgetrennt und mit Coomassie Brillantblau R-250 angefärbt. Aus dem Gel wurden 18 Proteinproben ausgestochen und einer massenspektrometrischen Analyse unterzogen. Von drei Proteinen (1-3) wurden Sequenzdaten erhalten.

sowie das Chlorophyll a/b-Bindeprotein CP29 (3). Diese Proteine können aber nicht mit der eigentlichen Funktion des TAC, der Transkriptelongation, in Zusammenhang gebracht werden und müssen daher als Verunreinigung angesehen werden. Da die entsprechenden Proteinbanden sehr prominent und in allen TAC-Präparationen detektierbar sind (3.1.1), ist anzunehmen, daß der TAC-Komplex über seine Assoziation an die Thylakoidmembran auch mit diesen Proteinen in Verbindung steht. Die bei Phosphorylierungsanalysen zum TAC-Komplex markierten zwei Proteine bei ca. 52-55 kD (Abb. 10) könnten die beiden hier identifizierten Untereinheiten der ATP-Synthase repräsentieren, die beide über Phosphorylierungsdomänen verfügen. ATP-Synthase-Untereinheiten scheinen nicht vom TAC abtrennbar zu sein und waren bereits in vorangegangenen Arbeiten im TAC detektiert worden (SUCK, 1996; KRAUSE, 1999). Da die Sequenzierung von Proteinen nach einer gelelektrophoretischen Auftrennung nicht erfolgreich war, wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. R. Oelmüller in Jena ca. 5  $\mu\text{g}$  Protein eines TAC II-Extraktes aus Spinat einem

tryptischen Verdau unterzogen und anschließend die Aminosäuresequenzen von Proteinen über massenspektrometrische Analyse ermittelt und mit Sequenzdaten von *A. thaliana* verglichen (2.24). In Tab. 4 sind die erhaltenen relevanten Daten zusammengefaßt.

Tab. 4 : Ermittelte Peptidsequenzen von TAC-Proteinen nach massenspektrometrischer Analyse und Vergleich mit Datenbanken von *A. thaliana*. Es sind jeweils das Molekulargewicht (MW) des Proteins, sowie dessen Domänen bzw. mögliche Funktion angegeben.

Peptid	NCBI- Zugangsnummer	MW des Proteins	Funktion/ Domäne
IQKHLEELSVLQEEMKK	gi:15224529	22 kD	Protein mit Kernlokalisation
LDDAFEMLSVLEVLCAAETR	gi:20805233	100 kD	'heat shock protein' DnaJ
IPESLSKYDFNAVDLSGNGFEG	gi:9294113	36 kD	Leucin-reiches Protein
RFNLSPSMKSLK	gi:12322447	79 kD	Zinkfingerprotein
	gi:8920629	82 kD	Zinkfingerprotein
	gi:15223228	79 kD	Zinkfingerprotein
LCVFRSNKHLYVQVIDDTK	gi:15221153	19 kD	ribosomale UE L18
SIDDSQSSVLSGPLVSVSFVQK	gi:15226447	30 kD	Membranprotein, Transporter
INSITSRNSKLFHMNILNCK	gi:15231771	46 kD	Polygalacturonase

Neben Proteinen, die nicht mit der plastidären Transkriptionsmaschinerie in Zusammenhang stehen dürften, wurde mehrere Proteine mit einer Zinkfingerdomäne identifiziert, die bislang nur aus dem Zellkern bekannt sind. Der Nachweis eines ribosomalen Proteins könnte darauf hindeuten, daß bereits kurz nach der Transkription die Translation initiiert wird.

### 3.2.6 Immundetektion von Proteinen in transkriptionsaktiven Extrakten

Bislang konnten nur wenige der mindestens 80 Proteine des TAC-Komplexes aus Chloroplasten identifiziert werden. Um weitere Proteine nachzuweisen, wurden verfügbare Antikörper, die gegen Proteine hergestellt wurden, die mutmaßlich in Verbindung mit der ptDNA oder der Transkriptions- und Translationmaschinerie von Plastiden stehen, für immunologische Analysen eingesetzt. Als gesichert gilt, daß alle Untereinheiten der PEP im

TAC-Komplex vorhanden sind (KRAUSE und KRUPINSKA, 2000). Exemplarisch wurde die  $\alpha$ -Untereinheit der PEP in TAC-Extrakten der drei bearbeiteten Pflanzenarten Mais, Gerste und Spinat immunologisch nachgewiesen (Abb. 13). Der Antikörper detektierte in allen TAC-Extrakten ein Protein von 39 kD. Diese Größe entspricht genau dem Molekulargewicht des *rpoA*-Genproduktes.

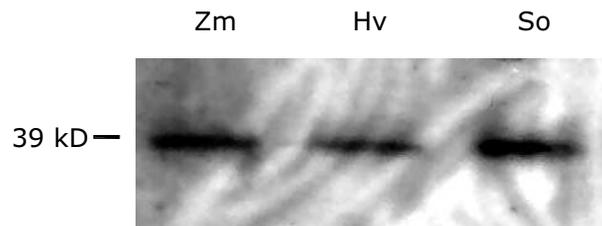


Abb. 13 : Immunologischer Nachweis der  $\alpha$ -Untereinheit der PEP in TAC I-Extrakten aus Mais (Zm), Gerste (Hv) und Spinat (So). Es wurden jeweils 2  $\mu$ g TAC-Proteine aufgetragen. Der Antikörper markiert in allen Extrakten das *rpoA*-Genprodukt mit einer Größe von 39 kD.

Eine bislang nicht abschließend beantwortete Frage ist, ob und welche nukleär kodierten RNAPs sich im TAC-Komplex befinden. Es konnten insgesamt drei Antikörper aus zwei unterschiedlichen Arbeitsgruppen getestet werden. Als Kontrolle wurde in Spur 1 jeweils 100 u einer käuflich erwerbbaaren T7-RNAP (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) aufgetragen, die eine sehr starke Homologie zu den bekannten NEPs vom Phagentyp aufweist. Während im Fall der T7-RNAP ein Signal bei dem erwarteten Molekulargewicht von ca. 110 kD erhalten wurde, war in den TAC-Extrakten kein Protein dieser Größe nachweisbar (Abb. 14). Stattdessen wurden durch den Antikörper Proteine mit Molekulargewichten von 80, 70 sowie 30 kD erkannt. Ob es sich hierbei um Spaltungsprodukte von NEPs handelt, müßte durch Sequenzierung der Proteine überprüft werden.

Der TAC-Komplex ist nicht nur zur Elongation von *in vivo* initiierten Transkripten fähig, sondern zeigt auch Spleißing- und Edierungsereignisse (AG KÖSSEL, Freiburg, unveröffentlicht). Wenn bereits eine posttranskriptionelle Modifizierung der Transkripte erfolgt, findet möglicherweise auch eine Bindung an ribosomale Untereinheiten statt. Darauf deutete auch die Identifizierung einer ribosomalen Untereinheit durch die Sequenzierung von Proteinen aus TAC-Extrakten hin (3.2.5). Mit Antikörpern gegen die 50S und 30S ribosomalen Unter-

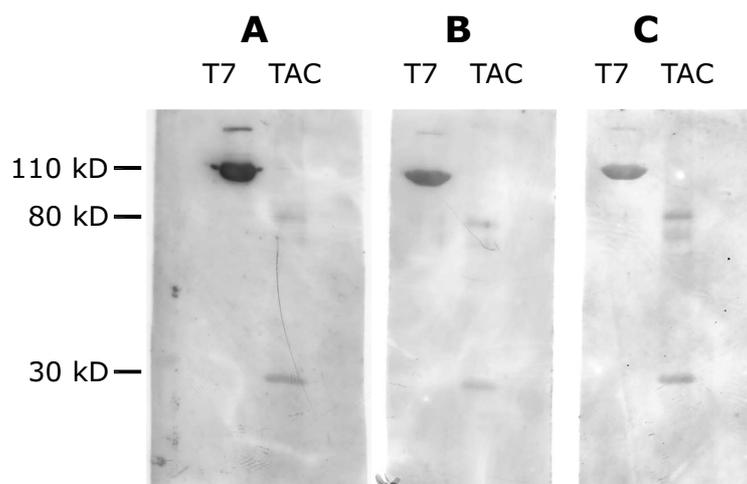


Abb. 14 : Immunologische Analyse eines TAC II-Extraktes aus Spinat mit verschiedenen Antikörpern gegen nukleär kodierte RNAPs vom Phagentyp. Es wurde jeweils eine 2  $\mu$ g Protein entsprechende Menge des TAC-Extraktes und 100 u T7-RNAP (MBI Fermentas, St. Leon-Roth) aufgetragen. A: Nachweis mit einem Antikörper gegen eine NEP aus Mais, B,C: Nachweis mit zwei verschiedenen Antikörpern gegen das Genprodukt von *rpoT;1* aus *A. thaliana* (2.20.1).

einheiten konnten jedoch keine eindeutigen, reproduzierbaren Ergebnisse für Chloroplasten- und TAC-Fractionen erhalten werden (nicht gezeigt).

Des weiteren wurde überprüft, ob das Protein MFP1 im TAC nachweisbar ist. MFP1 ist ein an die plastidären Nukleoide assoziiertes Protein von 81 kD, welches ursprünglich aus Tabakzellkulturen isoliert wurde (MEIER *et al.*, 1996). Dieses Protein ist an die Thylakoidmembran assoziiert und kolokalisiert mit den plastidären Nukleoiden. Das entsprechende Gen wurde auch im Genom von *A. thaliana* gefunden und untersucht (JEON *et al.*, 2003). Der gegen dieses Protein hergestellte Antikörper detektiert ein Protein mit dem entsprechenden Molekulargewicht in einer Plastidenfraktion aus *A. thaliana* (Abb. 15, At). In sämtlichen der zur Verfügung stehenden TAC-Extrakte, die aus Spinat, Gerste und Mais erhalten wurden, konnte kein Protein der gesuchten Größe mit dem Antikörper detektiert werden. Kreuzreaktionen sind lediglich bei ca. 60 kD und 90 kD in Mais (*Zm*) und 65 kD in Spinat (*So*) vorhanden. Es ist aber möglich, das MFP1-Homologe in verschiedenen Pflanzen ein unterschiedliches Molekulargewicht aufweisen.

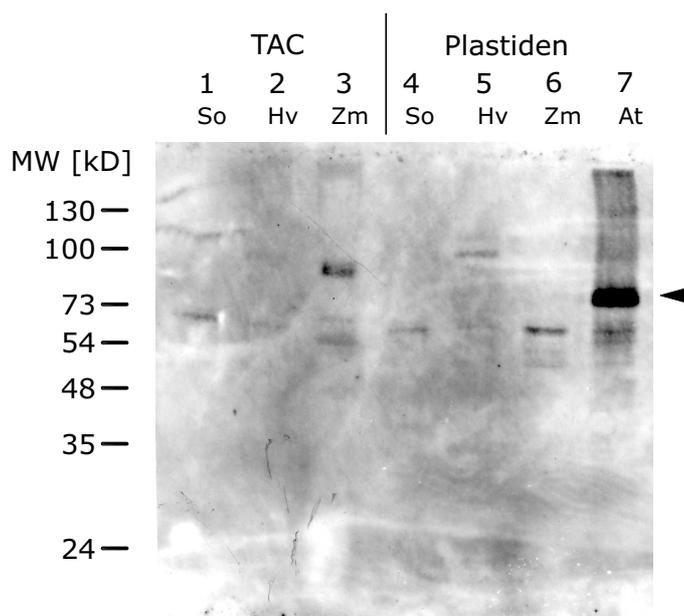


Abb. 15 : Immunologischer Nachweis des MFP1-Proteins aus *A. thaliana*. Es wurden jeweils 2  $\mu\text{g}$  TAC I-Extrakte aus Spinat (So), Gerste (Hv) und Mais (Zm), sowie 10  $\mu\text{g}$  Gesamtprotein von Plastiden dieser Pflanzen und aus *A. thaliana* (At) aufgetragen. Der Antikörper erkennt lediglich in der Plastidenfraktion von *A. thaliana* ein Protein von ca. 81 kD (Pfeil), welches der Größe von MFP1 entspricht.

Mit einem Antikörper gegen das TCP34-Protein ('tetratricopeptid-repeat-chloroplast-protein') konnte in TAC-Extrakten aus Spinatchloroplasten ein Signal auf der erwarteten Höhe von 34 kD erhalten werden (Abb. 16). In Gesamtproteinextrakten aus Chloroplasten (CP) ist ebenfalls ein Protein detektierbar, in der TAC-Fraktion scheint TCP34 jedoch angereichert vorzuliegen. Kreuzreaktionen des Antikörpers mit TAC-Proteinen mit Molekulargewichten von 25 und 17 kD sind in der Chloroplastenfraktion nicht festzustellen. TCP34 ist ein kernkodiertes Protein, das in die Chloroplasten importiert wird (SOKOLENKO, A., München, unveröffentlicht) und mit der Thylakoidmembran assoziiert ist. Es besitzt eine 'helix-loop-helix'- und eine TPR- (tetratricopeptid repeat) Domäne, die auf eine Interaktion mit Nukleinsäuren hindeuten. Um Kreuzreaktionen mit dem auf etwa gleicher Höhe laufenden Cytochrom f auszuschließen, wurden die verwendeten Membranen zunächst von den Antikörpern befreit (2.20.3) und erneut mit einem Antikörper gegen das Cytochrom f Protein inkubiert. Wie erwartet, konnte das Cytochrom f-Protein nur in den Chloroplastenextrakten nachgewiesen werden, nicht jedoch in der TAC-Fraktion. Ein Protein von 34 kD konnte auch über Photoaffinitätsmarkierung von TAC-Extrakten (2.22) radioaktiv

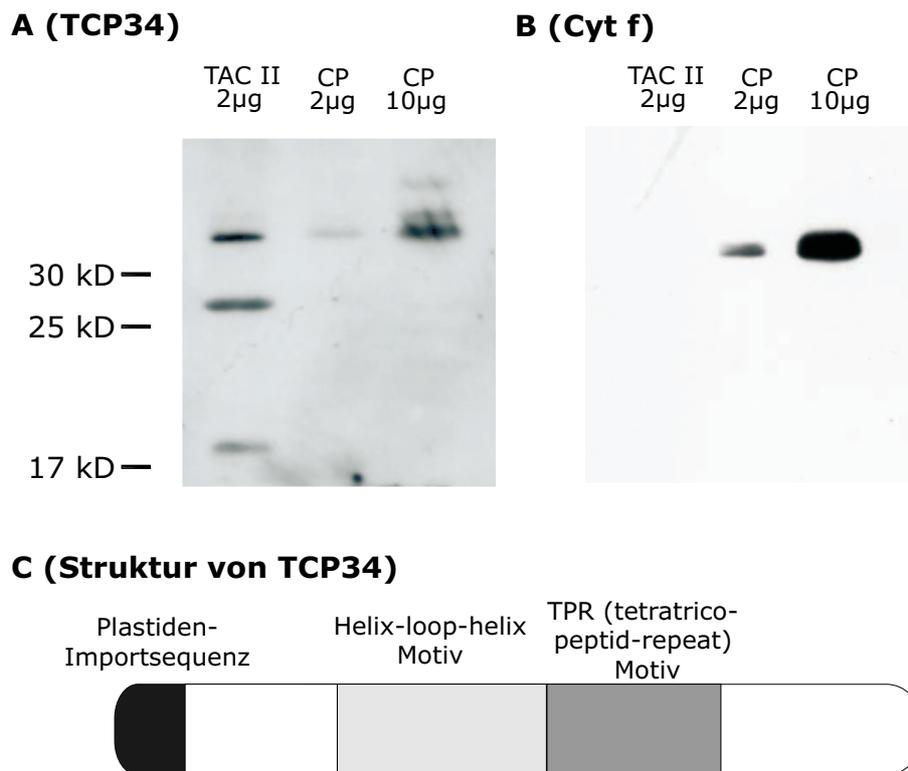


Abb. 16 : Immunologischer Nachweis des TCP34-Proteins in TAC II-Extrakten und Chloroplasten (CP) aus Spinat. Es wurden 2 µg Protein eines TAC II-Extraktes, sowie 2 bzw. 10 µg Gesamtprotein von Chloroplasten aus Spinat aufgetragen. Der Antikörper detektierte im TAC-Extrakt und in den Chloroplastenfraktion ein Protein von ca. 34 kD (A). Das auf gleicher Höhe laufende Cytochrom f war nur in Plastidenfraktionen nachweisbar (B). TCP34 besitzt eine Plastidenimportsequenz und zwei Domänen, die auf eine Interaktion mit Nukleinsäuren hindeuten (C).

markiert werden und anschließend mit dem Antikörper gegen TCP34 immunpräzipitiert werden (nicht gezeigt).

In Zusammenarbeit mit Prof. U. Wienand von der Universität Hamburg konnte ein Peptidantikörper gegen ein dort untersuchtes Protein aus Mais, das sogenannte ETCHED1-Protein (ET1), mit TAC-Fractionen getestet werden. Das ET1-Protein wird in die Plastiden importiert (DA COSTA E SILVA *et al.*, 2004) und besitzt eine sogenannte 'zinc-ribbon'-Domäne, die eine Bindung an DNA möglich macht. Daher war es von Interesse zu klären, ob dieses Protein in TAC-Extrakten enthalten ist. In einer 'Western-Blot'-Analyse mit TAC-Extrakten aus Spinat ist ein Signal bei ca. 12 kD zu erkennen, das genau der Größe des prozessierten und in die Chloroplasten importierten ET1-Proteins entspricht

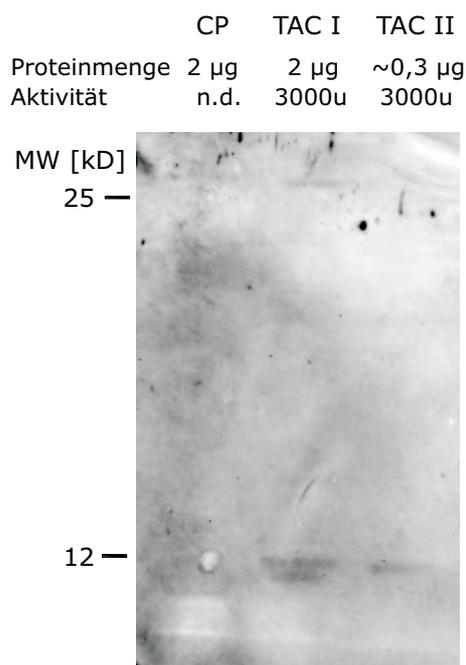


Abb. 17 : Immundetektion des ETCHED1-Proteins in TAC-Extrakten aus Spinatchloroplasten. Nach einer Chloroform/Methanol-Extraktion (2.16.4) der Proteine wurden jeweils 3000 u von TAC I und TAC II sowie ein Plastiden-Gesamtproteinextrakt in einem 16%igen 'High-Tris'-Polyacrylamidgel aufgetrennt (2.17.2) und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Mit einem spezifischen Antikörper gegen ET1 wurde ein 12 kD-Protein detektiert.

(Abb. 17). Während in TAC I-Fractionen noch eine zusätzliche Bande mit etwas geringem Molekulargewicht detektiert wurde, ist in der stark angereicherten TAC II-Fraktion nur eine einzige Bande bei 12 kD detektierbar. Eine Kreuzreaktion des Antikörpers mit einem 25 kD-Protein ist nur in TAC I, nicht in TAC II vorhanden. ET1 befindet sich offenbar im TAC und die ähnliche Signalintensität in den TAC I- und TAC II-Extrakten bei gleicher Transkriptionsaktivität beider Extrakte aber einer geringeren Proteinmenge in TAC II spricht für eine Anreicherung dieses Proteins während der Aufreinigung. Die Funktion von ET1 wurde noch eingehend untersucht (3.3).

### 3.2.7 Untersuchungen zum Einfluß von spezifischen Antikörpern gegen TAC-Proteine auf die Transkriptionsaktivität der TAC-RNAP

Der TAC-Komplex ist wie andere Elongationskomplexe äußerst resistent gegenüber Dissoziation (UPTAIN *et al.*, 1997). Selbst Behandlungen mit DNase oder SDS vermögen

den Komplex nicht aufzuspalten (MÜLLER, 2000). Es war zu überprüfen, ob es möglich ist, einzelne Komponenten oder Untereinheiten des TAC z.B. über Affinitätschromatographie selektiv aufzureinigen. Wenn eine Aufreinigung über Antikörper erfolgen soll, müssen die entsprechenden Proteine bzw. die antigenen Domänen auch für diese zugänglich sein und aus dem TAC 'herausragen'. Ob dies für die bislang bekannten TAC-Proteine der Fall ist, wurde durch Transkriptionsanalysen in Anwesenheit von Antikörpern untersucht (2.21). Falls ein Antikörper spezifisch ein Protein binden kann und dieses Protein die Transkriptionsaktivität der TAC-RNAP beeinflusst, sollte eine Reduktion der Aktivität zu beobachten sein. Daher wurden TAC-Extrakten verschiedene Konzentrationen der entspre-

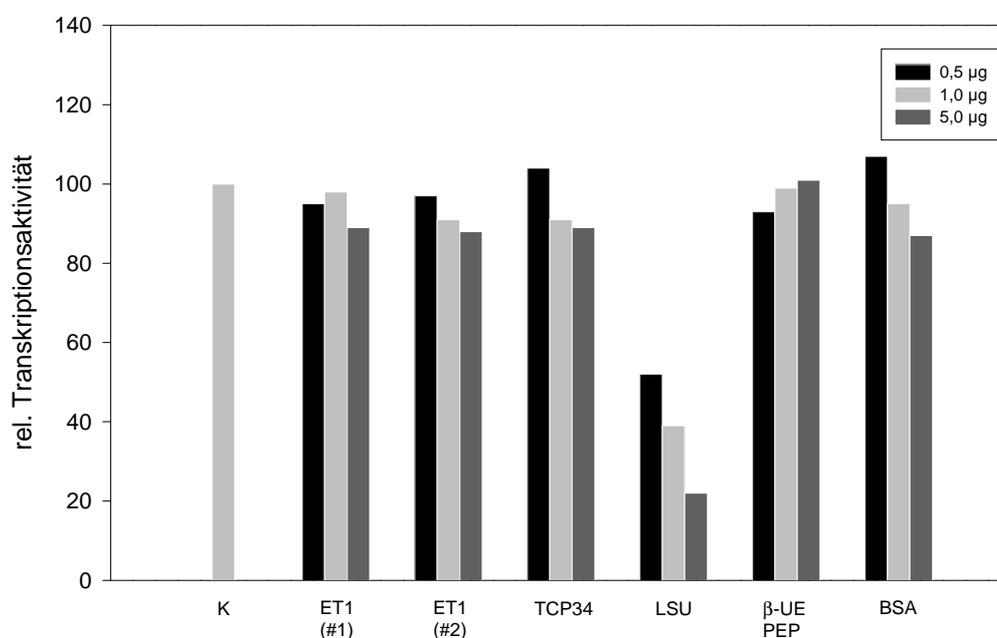


Abb. 18 : Transkriptionsaktivität von TAC II-Extrakten aus Spinat nach Zugabe von Antikörpern in verschiedenen Konzentrationen. 0,5, 1 und 5 µg Protein der jeweiligen Seren wurden einem Standard-Transkriptionsansatz hinzugefügt und die Transkriptionsaktivität nach 30 Min. gemessen. Die Werte wurden relativ auf eine Transkriptionsreaktion ohne Zugabe von Antikörpern (K=100) bezogen. ET1#1/#2: Antikörper gegen ETCHED1, TCP34: Antikörper gegen TCP34, LSU: Antikörper gegen die große Untereinheit der RuBisCO, β-UE/PEP: Antikörper gegen die β-Untereinheit der PEP, BSA: Rinderserumalbumin (2.20.1). Es sind die Mittelwerte von mindestens drei Messungen angegeben.

chenden Antikörper hinzugefügt und anschließend die Transkriptionsaktivität der Extrakte bestimmt. Ein Kontrollansatz ohne Antikörper diente als Referenz und alle anderen Wer-

---

te wurden relativ darauf bezogen. Die große Proteinmenge, die dem Ansatz hinzugefügt wurde, scheint keinen Einfluß auf die Transkriptionsaktivität zu haben, wie der Kontrollansatz mit BSA zeigt (Abb. 18). Offenbar ist aber keines der getesteten Proteine am TAC exponiert, um von einem spezifischen Antikörper gebunden zu werden. Es ist keine Hemmung der Transkription zu beobachten. Das Abfallen der Transkriptionsaktivität ein einem Kontrollansatz mit einem LSU-Antikörpers ist jedoch überraschend, da sich dieses Protein nicht im TAC befindet. Es ist aber möglich, daß eine antigene Domäne, an die der Antikörper bindet, auch in einem Protein des TAC vorliegt.

### 3.3 Charakterisierung des ETCHED1-Proteins

#### 3.3.1 Das ETCHED1-Protein

Das ETCHED1-Protein wird von dem Gen *etched1* (*et1*) kodiert, die Funktion des Proteins ist bislang unbekannt. In Mais kann dieses Gen mutiert vorliegen und Pflanzen solcher Linien zeigen einen komplexen Phänotyp. *Etched1* ist eine Mutation in Mais, die bereits 1940 von STADLER (1940) beschrieben und in einer Maispopulation von röntgenbestrahlten Körnern gefunden wurde. Diese rezessive, pleiotrope Mutation ist durch einen stark ausgeprägten Phänotyp charakterisiert. Zum einen besitzen die Körner Furchen und Risse (*eng. etched=geätzt*), zum zweiten hat die Mutation einen reduzierten Stärkegehalt der Körner zur Folge (SANGEETHA und REDDY, 1991) und eine abnormale Entwicklung der Aleuronschicht sowie des Endosperms (AHREND, 1998; GARG, 2002). Des Weiteren zeigen junge Sämlinge in den ersten Tagen nach der Keimung vireszente Blätter. Die zunächst fahlgrünen bis albinotischen Blätter ergrünen jedoch nach ca. 10-15 Tagen. Die Plastidenentwicklung junger Sämlinge ist verzögert (SANGEETHA *et al.*, 1986) und die Blätter besitzen einen reduzierten Chlorophyllgehalt (RAMESH *et al.*, 1984). In Abb. 19 sind alle durch das Fehlen des ET1-Proteins hervorgerufenen phänotypischen Ausprägungen der Mutation abgebildet.

Durch Isolierung des *et1*-Gens konnte abgeleitet werden, daß ET1 ein kernkodiertes Protein von 19 kD ist, welches über eine Plastiden-Importsequenz und eine sogenannte 'zinc-ribbon'-Domäne verfügt (Abb. 20). In dieser Domäne sind vier Cysteinreste lokalisiert, die ein Zinkatom binden können. Es konnte gezeigt werden, daß ET1 in die Plastiden importiert wird und das reife Protein ein Molekulargewicht von 12 kD hat (DA COSTA E SILVA *et al.*, 2004; GARG, 2002). Es weist hohe Sequenzhomologie zu dem Transkriptionsfaktor TFIIS auf (s. Anhang), von dem gezeigt werden konnte, daß dieser bei der Transkriptelongation eine wichtige Rolle spielt (KETTENBERGER *et al.*, 2003).

In Mais gibt es eine Duplikation des *et1*-Gens, das sogenannte *Zmzr1*-Gen ('*Zea mays* zinc ribbon1'). Homologe Gene konnten in auch in anderen Pflanzen gefunden werden (s. Anhang), und die entsprechenden Gene werden als *zr1*-Gene, deren Genprodukte als ZR1-Proteine bezeichnet. Die Genduplikation von *et1* liegt aber offenbar ausschließlich in Mais vor.

Es konnten noch zwei weitere Gruppen von *zr*-Genen in verschiedenen Pflanzen gefunden

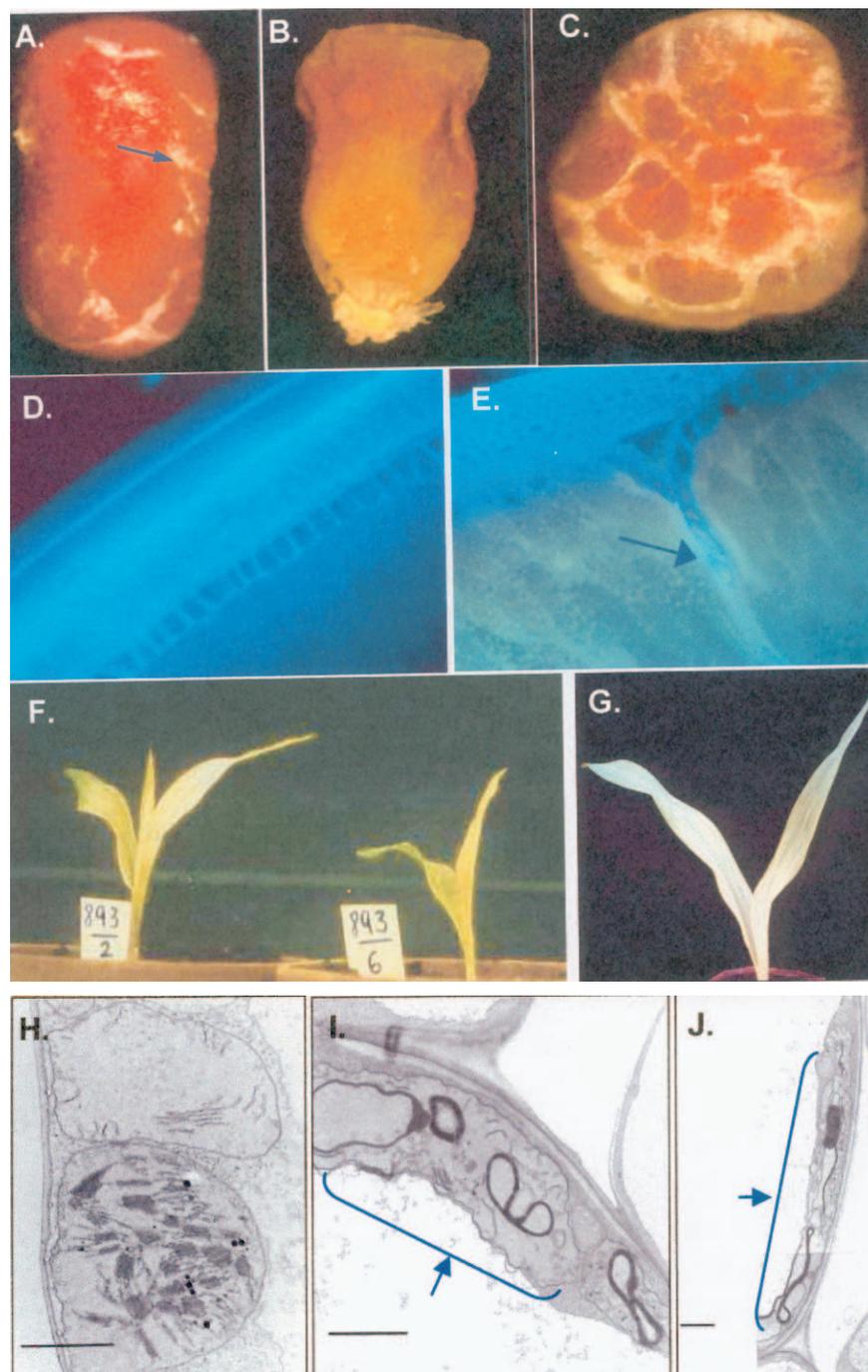


Abb. 19 : Phänotyp der ETCHED1-defizienten Maislinie et1-R im Vergleich zum Wildtyp von Mais. A-C: Körner der et1-R-Linie mit Riefen (*engl. etched=geätzt*); D-E: Endosperm vom Wildtyp mit kontinuierlicher Aleuronschicht und Endosperm (D) und et1-R-Mutante im Vergleich (E); F-G: hellgrüne bis weiße Sämlinge der et1-R-Linie, H-J: Chloroplasten vom Wildtyp (H) und et1-R-Pflanzen mit unterentwickelten und undifferenzierten Chloroplasten/Thylakoidmembranen (I,J), *aus DA COSTA E SILVA et al. (2004)*.

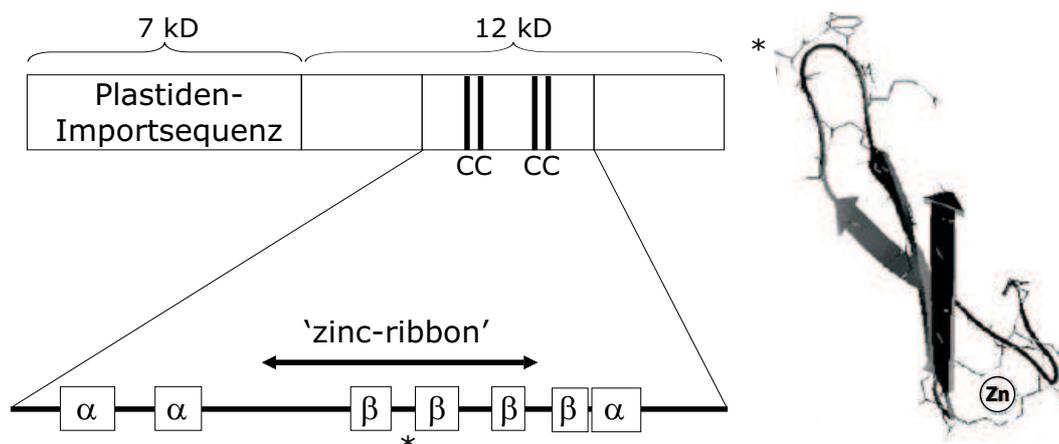


Abb. 20 : Struktur des ET1-Proteins mit einer Gesamtlänge von 163 Aminosäuren mit einer Plastiden-Importsequenz und einer 'zinc-ribbon'-Domäne. Das Molekulargewicht beträgt 19 kD bzw. 12 kD ohne die Chloroplasten-Transitsequenz. Die 'zinc-ribbon'-Domäne beinhaltet vier Cysteinreste (C), die ein Zinkatom binden können, sowie mehrere  $\alpha$ - und  $\beta$ -Faltblattstrukturen. Die drei zentralen  $\beta$ -Faltblätter sind in der 3D-Rekonstruktion des Proteins (rechts) als Pfeile dargestellt. An der mit einem Stern (\*) gekennzeichneten Stelle befindet sich ein saurer Aminosäurerest, der neben der  $\beta$ -Faltblattstruktur und den vier Cysteinresten auch charakteristisch für das verwandte TFIIIS Protein ist, verändert nach DA COSTA E SILVA *et al.* (2004).

werden, deren kodierte Proteine im Bereich der 'zinc-ribbon'-Domäne eine starke Ähnlichkeit zu der Aminosäuresequenz der ZR1-Proteine aufweisen. Die unter der Bezeichnung ZR3 zusammengefaßte Gruppe von Proteinen läßt aufgrund ihrer Sequenz auf eine Lokalisation in den Mitochondrien schließen, ZR2-Proteine sind wahrscheinlich ebenfalls in Organellen lokalisiert, können aber weder den Plastiden noch den Mitochondrien eindeutig zugeordnet werden. Möglicherweise liegt hier eine Mehrfachlokalisierung ('dual targeting') vor, wie sie bereits für einige andere Proteine (SILVA-FILHO, 2003), darunter auch für NEPs vom Phagentyp (HEDTKE *et al.*, 1999; RICHTER *et al.*, 2002) gezeigt werden konnte.

### 3.3.2 *In vitro*-Transkription und -Translation von *etched1* und Immunpräzitation des ET1-Proteins

Wie bereits in 3.2.6 gezeigt, konnte in TAC-Fraktionen von Spinat das ET1-Protein immunologisch nachgewiesen werden. Es war nun zu klären, ob der Antikörper tatsächlich spezifisch für das ET1-Protein ist. Es wurde zwar ein Protein detektiert, welches dem errechneten Molekulargewicht von ET1 entspricht und es ist auch eine Anreicherung dieses

Proteins im Zuge der TAC-Präparation zu erkennen, trotzdem wurde die Spezifität des Antikörpers noch einmal überprüft. Dazu wurde die aus Mais isolierte cDNA des *et1*-Gens (GARG, 2002) in einem *in vitro* Transkriptions/Translationssystem in das entsprechende Protein überschrieben, wobei es mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin und  $^{35}\text{S}$ -Cystein radioaktiv markiert wurde (2.5). Das Translationsprodukt wurde anschließend mit dem Antikörper, der gegen ein für ET1 spezifisches Peptid hergestellt worden war, aus dem Translationsansatz gefällt und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Nach der Immunpräzipitation konnte ein markiertes

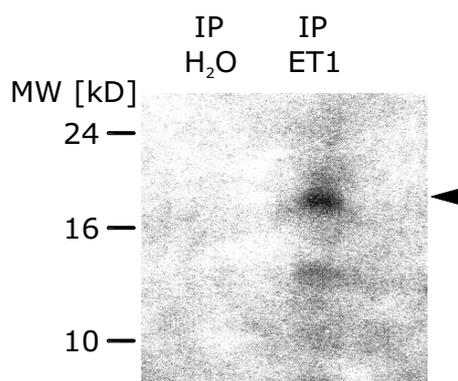


Abb. 21 : Immunpräzipitation des *in vitro* translatierten ET1-Proteins. Eine cDNA des vollständigen *et1*-Gens wurde in einem kombinierten Transkriptions/Translationsansatz in das 19 kD große Präprotein translatiert, welches anschließend mit einem Peptidantikörper gegen ET1-Protein präzipitiert wurde (ET1). Das Präzipitat wurde in einem 18%igen 'High-Tris'-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und das über  $^{35}\text{S}$ -Methionin und  $^{35}\text{S}$ -Cystein radioaktiv markierte Protein auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht. In einem Kontrollversuch wurde bei der Immunfällung Wasser statt des Antikörpers eingesetzt ( $\text{H}_2\text{O}$ ).

Protein von ca. 19 kD nachgewiesen werden (Abb. 21). Dieses Molekulargewicht entspricht der errechneten Größe des unprozessierten ET1-Proteins, dessen spezifische cDNA für dieses Experiment eingesetzt wurde. Die bei der Immundetektion in der TAC-Fraktion erhaltene Größe von ca. 12 kD (Abb. 17) ist das Molekulargewicht des importierten und von der Plastiden-Importsequenz befreiten ET1-Proteins. In einem parallel durchgeführten Experiment wurde bei der Immunpräzipitation statt des Antikörpers Wasser eingesetzt, um auszuschließen, daß durch Protein A-Sepharose eine unspezifische Fällung stattfindet. In diesem Fall wurde das *in vitro* translatierte ET1-Protein nicht gefällt (Abb. 21,  $\text{H}_2\text{O}$ ). Es konnte also gezeigt werden, daß der verwendete Antikörper nicht nur das prozessierte Protein bei der entsprechenden Größe im TAC detektiert, sondern auch das aus der cDNA *in vitro* hergestellte ET1-Protein.

### 3.3.3 Aufreinigung von TAC-Extrakten aus der *et1-R* Mutante von Mais

Nach Identifikation des ET1-Proteins in einer TAC-Fraktion aus Spinatchloroplasten (Abb. 17) und Überprüfung der Spezifität des Antikörper (Abb. 21) war das weitere Ziel die Charakterisierung dieses Proteins und die Untersuchung seiner Funktion im TAC. Eine weit verbreitete Methode zur Untersuchung einzelner Gene ist die Charakterisierung von Mutanten aus *A. thaliana*, bei der das zu untersuchende Gen z.B. durch T-DNA-Insertion nicht mehr exprimiert werden kann. Im Fall des ET1-Proteins konnte dieser Ansatz nicht gewählt werden. *A. thaliana* besitzt mit dem Gen *Atzr1* zwar ein zu *et1* homologes Gen, doch die homozygote Mutation von *Atzr1* ist letal. Dieser Umstand deutet auf eine essentielle Funktion von ET1 bei der Entwicklung der Pflanze hin. Die Lokalisation von ET1 im TAC und die Sequenzhomologie zu TFIIS legen eine wichtige Rolle bei der Transkription in Plastiden nahe. Vermutlich bleiben ET1-defiziente Maispflanzen - unter Ausprägung des zuvor beschriebenen Phänotyps - nur durch die Genduplikation von *et1* lebensfähig.

Die Genduplikation von *et1* in Mais machte es möglich, aus einer ET1-defizienten Maislinie (*et1-R* oder *et1*-Referenz-Linie) TAC-Extrakte zu isolieren. Allerdings steht von diesen Linien nur wenig Saatgut zur Verfügung. Weil zur Isolierung einer ausreichenden Menge an Chloroplasten für die TAC-Präparation eine große Menge Blattmaterial benötigt wurde, wurden ca. vier Wochen alte Pflanzen verwendet, die abgesehen von einem kleineren Wuchs den beschriebenen Phänotyp der Blätter nicht mehr aufwiesen, also bereits vollständig ergrünt waren. Zum Vergleich wurden TAC-Extrakte von Chloroplasten gleichaltr Pflanzen des Wildtyps isoliert.

### 3.3.4 Transkriptionsaktivität und Proteinzusammensetzung von TAC-Extrakten aus der *et1-R*-Linie von Mais

Nach dem Nachweis des ET1-Proteins im TAC wurden Analysen zur Funktion des Proteins durchgeführt. Die hohe Homologie zu dem Elongationsfaktor TFIIS deutet darauf hin, daß auch dieses Protein in die Transkription involviert ist. Zunächst wurde die Transkriptionsaktivität von TAC-Extrakten aus Wildtyp- (WT) Maispflanzen mit der von TAC-Extrakten der *et1-R*-Linie verglichen. Die Transkriptionsaktivität der TAC-Extrakte ist bei zwei TAC-Präparationen im Fall des Wildtyps etwa dreimal höher als im Fall der Mutante, was sowohl bei TAC I als auch TAC II zu beobachten ist (Abb. 22).

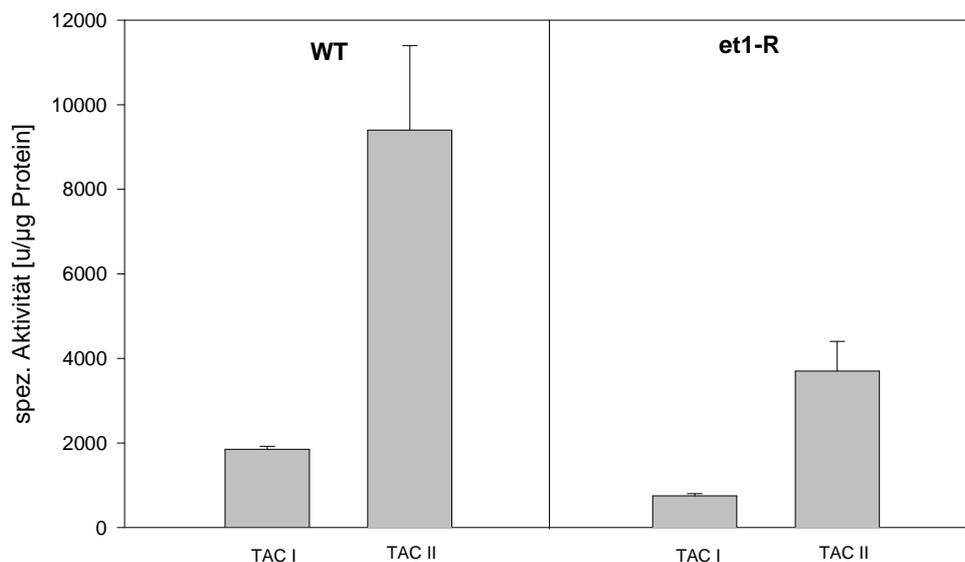


Abb. 22 : Transkriptionsaktivität von TAC-Extrakten aus Wildtyp-Mais (WT) und der ET1-defizienten Maislinie et1-R. Die Transkriptionsrate wurde in Standard-Transkriptionsansätzen bestimmt und anschließend auf die Proteinmenge der Extrakte bezogen (2.21). Es wurden die Mittelwerte und die Standardabweichungen anhand von vier unabhängigen Experimenten berechnet.

Das Proteinmuster beider TAC-Präparationen zeigt keine signifikanten Unterschiede (Abb. 23). Wie bereits bei der Untersuchung der Transkriptionsaktivität gezeigt wurde, wiesen die Proteinproben der et1-R-Linie eine reduzierte Aktivität im Vergleich zum Wildtyp bei gleichen Proteinmengen auf.

### 3.3.5 Immundetektion von ET1 und der $\alpha$ -UE der PEP

Nach der erfolgreichen Immunpräzipitation des *in vitro* translatierten ET1-Proteins wurde die in TAC-Fractionen aus Spinat durchgeführte 'Western-Blot'-Analyse des ET1-Protein mit TAC-Extrakten aus Mais wiederholt und hierbei auf derselben 'Western Blot'-Membran bei Auftrag gleicher Transkriptionsaktivitäten sowohl ET1 als auch die  $\alpha$ -Untereinheit der PEP (RPO A) nachgewiesen. Es wurden TAC-Extrakte der et1-R-Linie und des Wildtyps miteinander verglichen. In allen TAC-Extrakten kann die  $\alpha$ -Untereinheit der PEP nachgewiesen werden (Abb. 24). Dabei ist festzustellen, daß die erhöhte Transkriptionsaktivität in TAC II-Extrakten nicht mit einer erhöhten Signalstärke für dieses Protein einhergeht.

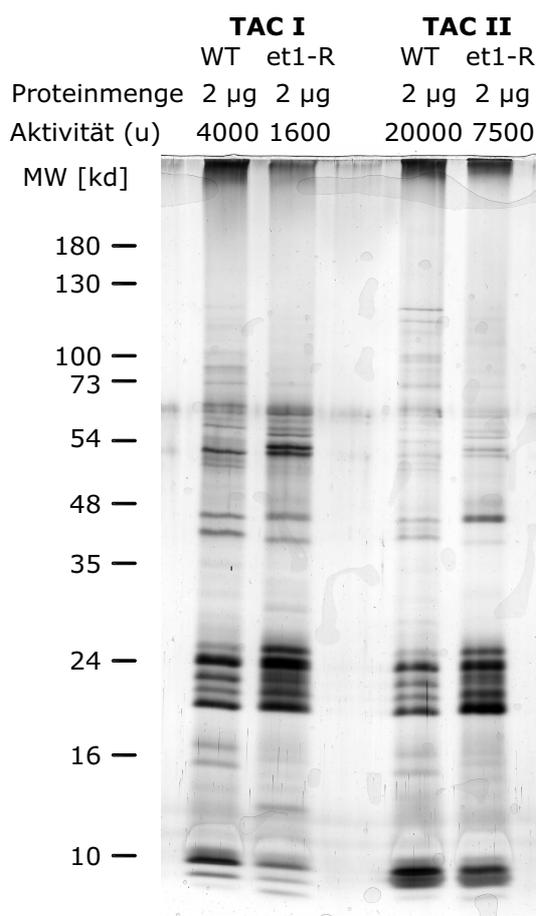


Abb. 23 : Vergleich der Proteinmuster von TAC-Extrakten aus Mais. Jeweils 2 µg TAC-Proteine von et1-R- und Wildtyp-Pflanzen wurden mittels Chloroform/Methanol-Extraktion von Nukleinsäuren befreit und in einem 7,5-15%igen SDS-Polyacrylamid-Gradientengel aufgetrennt. Die Proteine wurden durch Silberfärbung sichtbar gemacht.

Des weiteren ist erkennbar, daß die Signalintensitäten für das RPO A-Protein bei der et1-R-Linie in den vergleichbaren Fraktionen geringer ist als beim Wildtyp.

Bei der Immundetektion ist ET1 in Gesamtproteinextrakten aus Maischloroplasten nicht nachweisbar (CP). In TAC I-Extrakten sind in Mais wie in Spinat zusätzliche Signale nachweisbar, die aber in TAC II nicht mehr auftreten. Daher dürfte es sich bei diesen Signalen um unspezifische Markierungen handeln. Das ET1 Protein wird wie in Spinatextrakten bei seinem Molekulargewicht von 12 kD detektiert. Außerdem wurde ET1 bei der TAC-Präparation offenbar angereichert. Dafür spricht die stärkere Signalintensität in TAC II im Vergleich zu TAC I (WT), denn in beiden Proben wurde die gleiche Proteinmenge eingesetzt. In der Mutante (et1-R) mußte deutlich mehr Protein eingesetzt werden, um eine

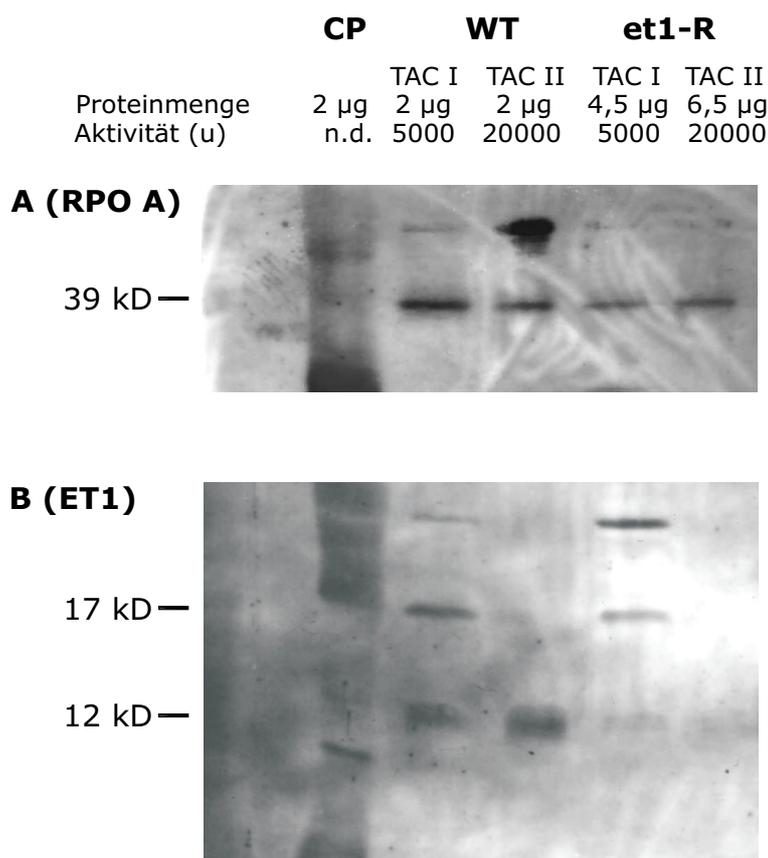


Abb. 24 : Immundetektion der  $\alpha$ -Untereinheit der PEP und des ET1-Proteins in Chloroplasten (CP) und TAC-Extrakten von Wildtyp und *et1-R*-Mutante aus Mais. Die durch Chloroform/Methanol-Extraktion gefällten TAC-Proteine wurden in einem 16%igen 'High-Tris' Polyacrylamidgel ihrer Größe nach aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Membran wurde bei ca. 30 kD geteilt. Im höhermolekularen Bereich wurde RPO A (A), im niedermolekularen Bereich ET1 immundetektiert (B). Von TAC I und TAC II-Extrakten wurden 5000 bzw. 20000 u aufgetragen, die jeweils der angegebenen Proteinmenge entsprachen.

vergleichbare Transkriptionsaktivität der TAC-RNAP zu erreichen. In diesen Proben ist bei dem Molekulargewicht von ET1 in TAC I-Fractionen eine sehr schwache Bande detektiert. Dieses Signal kann aber weder von ET1 noch dem sequenzhomologen ZR1-Protein stammen, da es in TAC II-Extrakten nicht nachweisbar ist.

### 3.3.6 Genspezifität der TAC-RNAP

Es konnte gezeigt werden, daß die TAC-RNAP aus ET1-defizienten Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp eine stark verringerte Transkriptionsrate aufweist. Im folgenden wurde untersucht, ob sich dieser Unterschied auch qualitativ auf die Transkription einzelner Gene

auswirkt. Eine differentielle Genexpression könnte auch Hinweise darauf geben, mit welcher RNAP - NEP oder PEP - das ET1-Protein interagiert. Zur Aufklärung dieser Frage wurden *in vitro*-Transkripte beider TAC-Fraktionen auf DNA-'Dot-Blot'-Membranen hybridisiert (2.15.2), auf denen insgesamt 22 plastidäre Genfragmente in jeweils mehreren Konzentrationen aufgetragen wurden (2.4).

Es konnte festgestellt werden, daß sich die Muster TAC-Transkripte aus dem Wildtyp und der *et1*-R-Linie nicht unterscheiden (Abb. 25). Offenbar wird durch das Fehlen von ET1 die Genspezifität des Transkriptionsapparates nicht verändert. Eine Kreuzhybridisierung der Membranen mit den jeweils anderen TAC-Transkripten lieferte ein identisches Ergebnis. Die erhaltenen Transkriptionsmuster zeigen wie die TAC-Transkripte aus Spinat (KRAUSE, 1999) starke Signale bei ribosomalen Genen und Genen, die für Proteine des Photosyntheseapparates kodieren.

Die identischen Transkriptionsmuster können darauf zurückzuführen sein, daß die Präparation der TAC-Extrakte in beiden Fällen aus grünem Blattmaterial erfolgte. Die Blätter von *et1*-R-Pflanzen zeigen lediglich in den ersten Tagen nach der Keimung vireszente Blätter. Die TAC-Aufarbeitung erfolgte aus Materialgründen aus ca. vier Wochen alten Pflanzen. Zu diesem Zeitpunkt zeigen die Pflanzen der Mutante abgesehen von einem etwas kleineren Wuchs keinen Unterschied zum Wildtyp. Das Fehlen von ET1 in der Mutante hat offenbar keinen Einfluß auf die Spezifität der TAC-RNAP in dieser Entwicklungsphase. Lediglich die Transkriptionsaktivität ist eingeschränkt. Es ist aber nicht auszuschließen, daß in einer früheren Phase der Entwicklung Unterschiede bezüglich der Spezifität auftreten. Aufgrund der verzögerten Chloroplastenentwicklung ist ein für Proplastiden typisches Transkriptionsmuster zu erwarten.

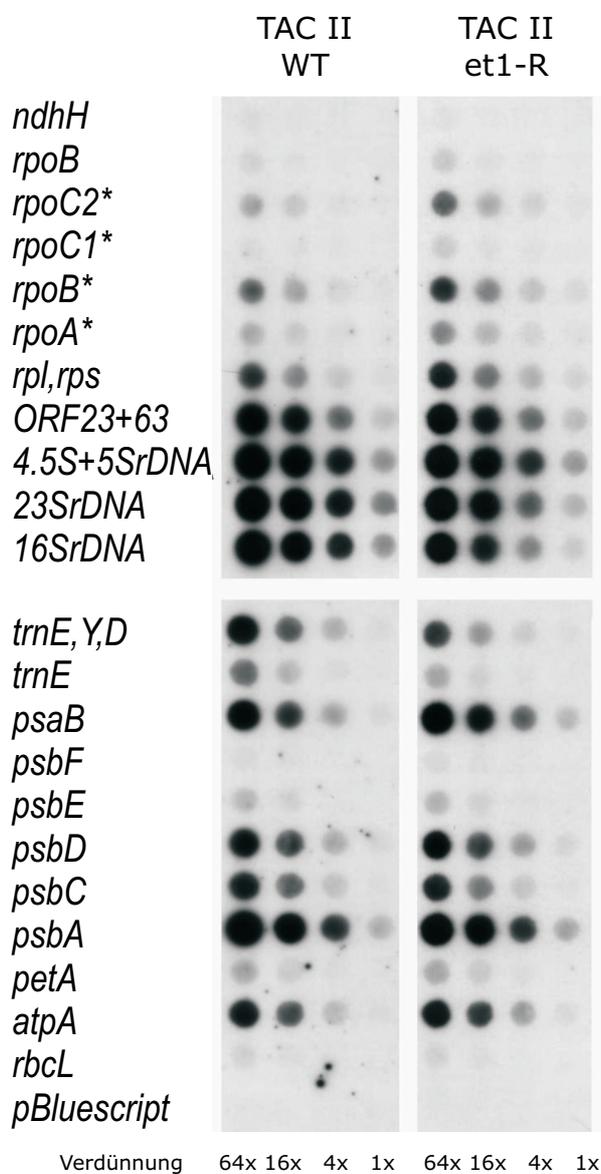


Abb. 25 : Autoradiogramme nach der Hybridisierung von *in vitro*-Transkripten von TAC II-Extrakten aus WT und der et1-R-Mutante von Mais. Identische DNA-'Dot-blot'-Membranen, auf denen plastidäre Genfragmente aus Gerste oder Mais (\*) in verschiedenen Konzentrationen (1x bis 64x) immobilisiert worden sind. Die *in vitro*-Transkripte wurden aus zehnfachen Transkriptionsansätzen mit TAC-Extrakte aus WT und et1-R isoliert (2.15.2). Es wurden jeweils identische Mengen radioaktiv markierter Transkripte für die Hybridisierung eingesetzt. Eine Kreuzhybridisierung beider Membranen lieferte ein identisches Ergebnis.

### 3.3.7 Induktion einer Endonukleaseaktivität der TAC-RNAP durch ET1

Aufgrund der Sequenzhomologie zum Transkriptionsfaktor TFIIS (s. Anhang) kann für ET1 eine Funktion als Elongationsfaktor angenommen werden. Von allen RNA-Polymerasen ist bekannt, daß sie auch eine hydrolytische Aktivität besitzen, die es ihnen ermöglicht, kurze RNA-Fragmente vom naszierenden 3'-Ende abzuspalten. Diese sogenannte 'cleavage'-Reaktion wird in Bakterien vom Elongationsfaktor GreB (OPALKA *et al.*, 2003), in Archaeobakterien durch TFS (HAUSNER *et al.*, 2000) und in eubakteriellen RNAP II-Komplexen durch TFIIS induziert (KETTENBERGER *et al.*, 2003). Dementsprechend wurde untersucht, ob eine derartige Funktion auch für ET1 in Plastiden nachzuweisen ist. Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurden die Transkriptionsraten von TAC-Extrakten aus Wildtyp und ET1-defizienten Pflanzen unter Zugabe des ATP-Analogons Cordycepin (3'dATP) bestimmt (2.21.5). Wird während der Transkription statt ATP Cordycepin in die RNA eingebaut, kommt es zum Stoppen der Elongation, da aufgrund der fehlenden Hydroxylgruppe am 3'-Ende des 3'dATP kein weiteres Nukleotid an die RNA synthetisiert werden kann. Die Transkription kann ohne die Abspaltung dieses Nukleotids nicht fortgesetzt werden. Es wurden die Transkriptionsraten von TAC II-Extrakten mit und ohne Zugabe von Cordycepin gemessen und relativ aufeinander bezogen (Abb. 26). Dabei wurde das ATP-Analogon dem Reaktionsansatz nach 10 Min. in 25fachem Überschuss im Vergleich zu den übrigen Nukleotiden zugesetzt und die Transkriptmenge zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. Aufgrund der unterschiedlichen Aktivitäten der TAC-RNAP des Wildtyps und *et1-R*-Mutante (3.3.4) wurde die nach 40 Min. erhaltene Gesamtaktivität in beiden Fällen auf 100 gesetzt, um die erhaltenen Kinetiken besser miteinander vergleichen zu können. Es ist zu erkennen, daß die relative Transkriptmenge in beiden Präparationen bei 30°C in etwa linear zunimmt (Abb. 26A, Kontrolle). Wurde dem Transkriptionsansatz das modifizierte Nukleotid zugesetzt, sank die Transkriptakkumulation in beiden Fällen erheblich ab (+3'dATP). Es ist aber jeweils ein Anstieg in dem gemessenen Zeitraum zu verzeichnen. Dies zeigt, daß eine endonukleolytische Aktivität und eine Wiederaufnahme der RNA-Synthese vorliegt. Wäre dies nicht der Fall, wäre keine Zunahme der Transkriptmenge nachweisbar. Die Reaktivierung der Elongation erfolgte im Wildtyp aber deutlich schneller als in der Mutante. Im Vergleich zum Wildtyp war hier in den ersten Minuten nach Zugabe von Cordycepin sogar eine reduzierte Transkriptmenge zu messen. Auch wenn die

Aktivität der TAC-RNAP aus et1-R-Pflanzen im weiteren Verlauf nach ca. 25 Min. wieder zunimmt, wird im Zeitraum von 40 Min. das Niveau vom Wildtyp nicht erreicht. Es war nun noch von Interesse zu klären, inwieweit der Einbau des modifizierten Nukleotids und die Wiederaufnahme der Transkription von der Temperatur abhängig ist. Die Endonuklea-

A	WT					et1-R				
	10	15	25	30	40	10	15	25	30	40
30°C										
Kontrolle	26,7±9,1	49,0±3,6	86,7±11,4	97,3±18,0	133,0±7,0	24,0±1,4	30,0±2,8	38,5±2,1	44,5±2,1	54,0±4,2
+3'dATP	27,3±8,4	42,7±2,5	50,5±2,1	55,0±4,2	68,0±9,9	24,0±1,4	16,5±2,1	16,5±2,0	18,5±3,5	26,6±1,4
15°C										
Kontrolle	24,7±0,6	36,0±2,0	58,3±8,5	70,5±0,7	83,3±5,8	7,0±0,0	11,0±1,4	22,5±4,9	28,5±3,5	35,5±6,4
+3'dATP	25,0±1,0	32,3±5,7	45,7±2,1	50,0±2,8	54,3±12,6	7,0±0,0	7,5±0,7	13,0±2,8	13,5±0,7	15,5±0,7

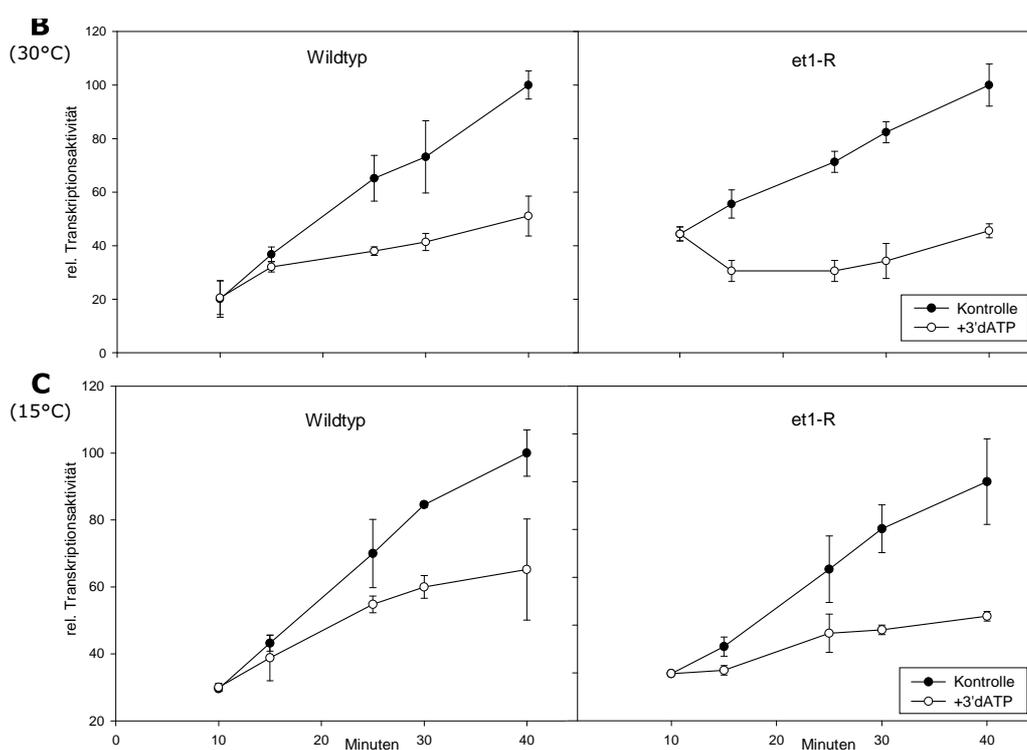


Abb. 26 : Transkriptionsaktivität von TAC II-Extrakten aus Mais. Die Transkriptionsaktivität von TAC II aus Wildtyp und et1-R-Linie wurde zu verschiedenen Zeitpunkten und bei einer Temperatur von 30°C und 15 °C gemessen. Neben einer Kontrollreihe mit einer Nukleotidkonzentration von 2  $\mu$ M wurde den Ansätzen nach 10 Min. das modifizierte Nukleotid Cordycepin (3'dATP) in einer Endkonzentration von 50  $\mu$ M zugesetzt. Bei der graphischen Darstellung der absoluten Werte (A) wurde die Transkriptionsaktivität der Kontrolle nach 40 Min. auf den Wert 100 festgesetzt (B,C) und die übrigen Meßwerte relativ darauf bezogen. Die Standardabweichung wurde anhand von vier unabhängigen Experimenten berechnet.

seaktivität in Bakterien durch den Faktor GreA scheint einer Temperatursensitivität zu unterliegen (SPARKOWSKI und DAS, 1990). Die geringe absolute Transkriptionsaktivität bei 15 °C im Vergleich zu 30°C ist darauf zurückzuführen, daß bei sinkenden Temperaturen die Aktivität von Enzymen im allgemeinen abnimmt. Die relative Transkriptakkumulation der Kontrollexperimente bei 15°C zeigte aber einen ähnlichen Verlauf wie bei 30°C (Abb. 26B). Nach Zugabe von Cordycepin war für die TAC-RNAP aus et1-R-Pflanzen kein so starker Abfall der Transkriptionsaktivität zu verzeichnen, wie dies bei 30°C der Fall ist, und die relativen Transkriptmengen der TAC-Extrakte steigen sowohl beim Wildtyp als auch bei der ET1-defizienten Linie steigen linear an. Möglicherweise besitzen die RNA-Synthese und die Endonukleaseaktivität eine unterschiedliche Temperatursensitivität.

### 3.3.8 Bestimmung der Länge von 'cleavage'-Produkten durch die Endonukleaseaktivität von RNA-Polymerasen

Die Untersuchungen zur zeitabhängigen Transkription in An- und Abwesenheit von Cordycepin zeigten, daß die TAC-RNAP eine endonukleolytische Aktivität besitzt. Da verschiedene RNAPs wie die RNAP II oder die RNAP von *E. coli* auch unterschiedlich lange RNA-Fragmente durch die 'cleavage'-Reaktion erzeugen, wurde auch die Länge der entstehenden 'cleavage'-Produkte der TAC-RNAP bestimmt. Von der Untersuchung dieser RNA-Fragmente, die von der TAC-RNAP abgespalten werden, wurden auch Hinweise auf den Interaktionspartner von ET1 - PEP oder NEP - erwartet. Die Bestimmung der Länge von 'cleavage'-Produkten erfolgte in hochprozentigen Polyacrylamidgelen mit Harnstoff, wobei radioaktiv markierte RNA-Oligonukleotide als Größenstandards verwendet wurden (2.12.3). Es wurden sowohl die Länge der Hydrolyseprodukte der TAC-RNAP als auch einer löslichen plastidären RNAP-Fraktion aus Mais (2.9) bestimmt (Abb. 27). In allen TAC-Extrakten konnten 'cleavage'-Produkte nachgewiesen werden, die eine Länge von 8-13 Nukleotiden aufwiesen. Dies trifft für den Wildtyp und die et1-R-Linie gleichermaßen zu. Die Menge der 'cleavage'-Produkte scheint im Wildtyp höher zu sein. Obwohl weniger Protein eingesetzt wurde, liegen hier mehr RNA-Abspaltungsprodukte vor als in der Mutante. Durch Zugabe von Cordycepin, welches die Transkription stoppt, konnte die endonukleolytische Aktivität der TAC-RNAP in beiden TAC-Präparationen erhöht werden, wie aus den stärkeren Signalen in den entsprechenden Spuren abzuleiten ist. In einer

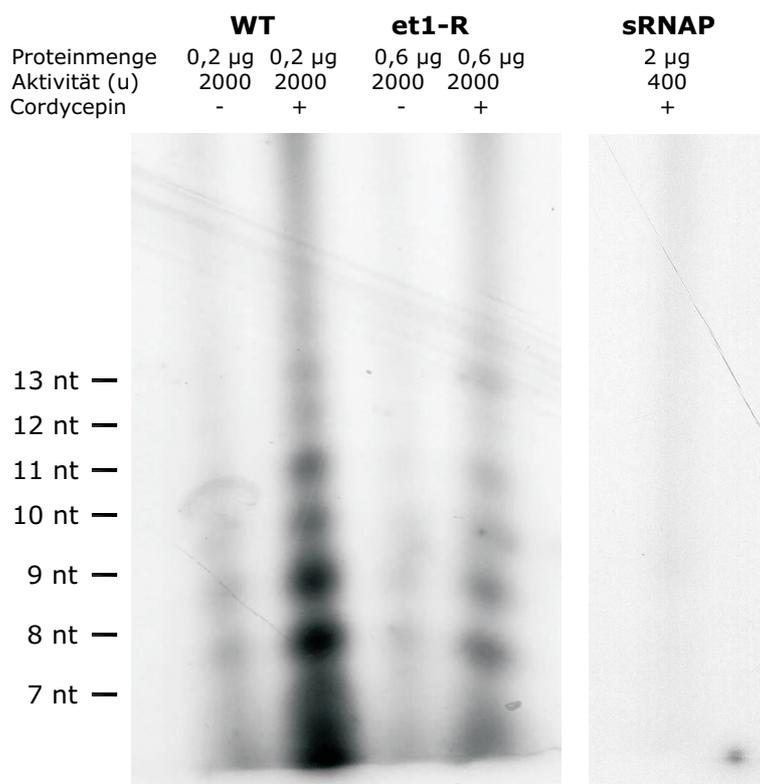


Abb. 27 : Bestimmung der Länge von Hydrolyseprodukten, die von der TAC-RNAP abgespalten werden. TAC-Extrakte aus Wildtyp Mais (WT) und der et1-R-Linie wurden mit (+) und ohne (-) Zugabe von Cordycepin in einem Standard-Transkriptionsansatz (2.21) für 30 Minuten bei 30°C inkubiert. Eine lösliche plastidäre RNAP-Fraktion wurde unter den gleichen Bedingungen unter Zugabe exogener Plastiden-DNA analysiert. Die erhaltenen *in vitro*-Transkripte wurden mittels Phenol/Chloroformextraktion (2.15.2) isoliert und in einem 28%igen Polyacrylamidgel mit 8 M Harnstoff aufgetrennt (2.12.3).

löslichen RNAP-Fraktion aus Maischloroplasten wurden keine RNA-Abspaltungsprodukte detektiert.

### 3.3.9 Entwicklungsabhängige Expression von *zr*-Genen

Die et1-R-Linie von Mais zeigt einen auffälligen Phänotyp. Neben der unvollständigen Ausbildung des Endosperms weist sie auch eine verzögerte Plastidenentwicklung auf und eine verspätete Ergrünung der Sämlinge auf. Eine entscheidende Frage in diesem Zusammenhang ist, ob die Expression des *et1*-Gens direkt damit in Zusammenhang zu bringen ist. Von Gräsern ist bekannt, daß deren Blätter einen Entwicklungsgradienten von Zellen und deren Chloroplasten aufweisen (FALK, 1994; LEECH *et al.*, 1973; OLDENBURG und BEN-

DICH, 2004). So findet man alle Abstufungen von meristematischem Gewebe im Bereich der Blattbasis bis hin zu völlig ausdifferenziertem, photosynthetisch voll aktivem Gewebe an der Blattspitze innerhalb eines Blattes. Zur Untersuchung der entwicklungsabhängigen Expression einzelner Gene wurde, wie für ein Primärblatt der Gerste exemplarisch in Abb. 28A dargestellt, Gesamt-RNA aus einzelnen Segmenten von 1 cm Länge des ersten Folgeblattes von Mais von der Blattbasis bis zu grünem Gewebe isoliert (2.11). Die RNA wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf Nylonmembranen immobilisiert (2.13). Anschließend erfolgte eine Hybridisierung mit spezifischen Sonden für das Transkript von *et1* und das von *rbcS* als Marker für eine entwicklungsabhängige Genexpression. Während für das *rbcS*-Transkript, welches für die kleine Untereinheit der RuBisCO kodiert, erwartungsgemäß eine Erhöhung der Genexpression in grünem Gewebe erkennbar war, konnte kein Transkript von *et1* detektiert werden (nicht gezeigt).

Da die Untersuchung der entwicklungsabhängigen Expression des *et1*-Gens in Mais nicht erfolgreich war, wurde für diesen Ansatz auf die Modellpflanze Gerste zurückgegriffen. Man kann in 7-10 Tage alten Primärblättern der Gerste einen klaren Entwicklungsgradienten, sowohl was die Zelltypen als auch die Chloroplastendifferenzierung betrifft, erkennen und die entwicklungsabhängigen Expression von Genen untersuchen (FALK *et al.*, 1993). In den zugänglichen Datenbanken der Gerste konnte bislang nur eine Kopie eines *et1*-homologen Gens gefunden werden, welches als *Hvzr1* bezeichnet wird.

Es wurde Gesamt-RNA aus verschiedenen Blattsegmenten des Primärblattes isoliert (Abb. 28A), gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und mit einer spezifischen Sonde für das *Hvzr1*-Transkript hybridisiert. Weiterhin wurde Gesamt-RNA aus der ribosomen-defizienten Gerste 'Albostrians' isoliert, aus deren Körnern sich zu jeweils 10 % weiße und grüne, sowie zu 80 % intermediäre (grün-weiß-gestreifte) Pflanzen entwickeln (HESS *et al.*, 1993; HÜBSCHMANN und BÖRNER, 1998). Zusätzlich wurde damit noch die Expression in etiolierten Primärblättern und Wurzeln der Gerste verglichen. Das Autoradiogramm der Hybridisierung des 'Northern-Blots' mit der für *Hvzr1* spezifischen Sonde zeigt deutlich eine entwicklungsabhängige Expression des Gens (Abb. 28). Während der Transkriptgehalt von *Hvzr1* in jungem Gewebe sehr hoch ist, nimmt die Signalstärke mit zunehmendem Alter stark ab. Die 'Albostrians'-Mutante wies in weißen Pflanzen das

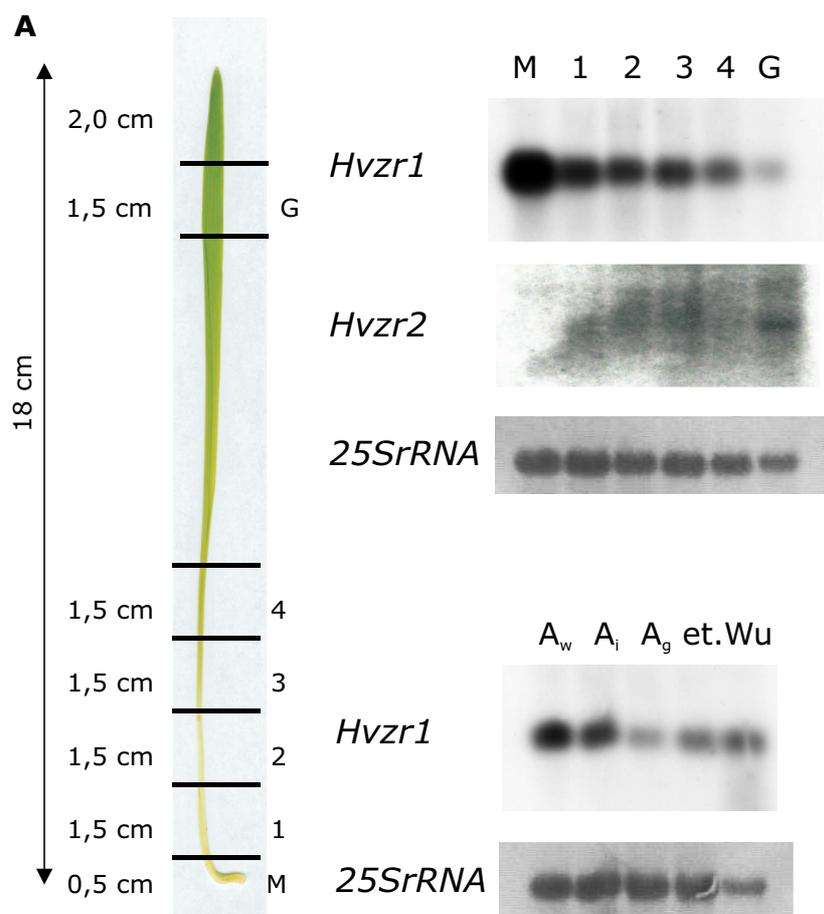


Abb. 28 : Untersuchung der entwicklungsabhängigen Expression von *Hvzr1* und *Hvzr2*. Es wurde Gesamt-RNA aus verschiedenen Segmenten von Primärblättern der Gerste (*Hordeum vulgare* var. Steffi) präpariert; von meristematischem (M) über sich differenzierendes und ergrünendes Gewebe (1-4) bis hin zu voll ausdifferenziertem Gewebe (G). Des weiteren wurde Gesamt-RNA aus der ribosomendefizienten 'Albostrians'-Linie der Gerste (w:weiße, i:intermediäre, g:grüne Pflanzen), etiolierten Blättern (et.) und Wurzeln (Wu) aufgetragen. Die RNA wurde in einem Agarose-Gel mit Formaldehyd elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und jeweils mit den radioaktiv markierten Sonden von *Hvzr1* und *Hvzr2* hybridisiert. Als Beladungskontrolle ist die mit Methylenblau angefärbte 25SrRNA abgebildet.

stärkste Signal auf. Aus diesem Ergebnis kann gefolgert werden, je undifferenzierter die Plastiden sind, desto stärker ist die Expression von *Hvzr1*.

Auch in etiolierten Blättern sowie in Wurzeln scheint *Hvzr1* in einem geringen Maße transkribiert zu werden. In Mais wird *et1* ebenfalls in verschiedenen Geweben, wie Stengel, Wurzel, Korn und etiolierten Pflanzen schwach transkribiert (DA COSTA E SILVA *et al.*, 2004).

Neben der Expression von *Hvzr1* wurde auch die des verwandten Gens *Hvzr2* untersucht. Dieses Gen stellt einen Vertreter der zu den *zr1*-Genen verwandten Gruppe von Genen dar, die als *zr2*-Gene bezeichnet werden (s. Anhang). Die Analyse der Aminosäuresequenzen von *zr2*-Genen lassen auf eine Lokalisation in Chloroplasten oder Mitochondrien schließen. Mit GFP fusionierte Kopien des *zr2*-Genproduktes von *A. thaliana*-Genproduktes (*Atzr2*) deuten allerdings auf eine Plastidenlokalisierung hin (AG WIENAND, Hamburg, unveröffentlicht). Daher wurde die Expression von *Hvzr2* ebenfalls zu untersucht.

Interessanterweise wird *Hvzr2* genau gegenläufig zu *Hvzr1* exprimiert (Abb. 28). Die stärkste Expression findet sich in völlig ausdifferenziertem Gewebe, wobei die Transkriptmenge im Vergleich zu *Hvzr1* insgesamt geringer zu sein scheint. Möglicherweise wird die Funktion des Genproduktes von *Hvzr1* in einem späteren Entwicklungsstadium der Pflanze von dem von *Hvzr2* übernommen. Es ist auch denkbar, daß die beiden Proteine mit verschiedenen RNAPs zusammenarbeiten, legt man eine entwicklungsabhängige Aufgabenteilung plastidärer RNAPs zugrunde (MALIGA, 1998). So könnten ZR1-Proteine in einer frühen Entwicklungsphase mit der NEP, ZR2-Proteine in ausdifferenzierten Plastiden mit der PEP interagieren. Über die *in vivo* tatsächlich vorliegende Proteinmenge, die von Genen der *zr*-Familie kodiert wird, kann aufgrund dieser Daten noch keine Aussage gemacht werden.

### 3.4 Aufreinigung von löslichen RNAP-Extrakten aus Maischloroplasten

Lösliche transkriptionsaktive Extrakte aus Plastiden (sRNAP) wurden wie bei LIERE und MALIGA (1999) beschrieben präpariert. Chloroplasten wurden über einen Percollgradienten isoliert (2.7.2), anschließend lysiert und die löslichen Proteine durch eine Ammoniumsulfatfällung und Dialyse gewonnen (2.9).

#### 3.4.1 Proteinzusammensetzung von sRNAP-Extrakten und Immundetektion von Proteinen

Die löslichen transkriptionsaktiven Extrakte aus Maischloroplasten enthalten eine große Anzahl von Proteinen (Abb. 29), von denen nur ein geringer Teil tatsächlich mit der plastidären Transkription in Verbindung stehen dürfte. In früheren Präparationen konnten sowohl Untereinheiten der PEP als auch NEPs in löslichen RNAP-Fractionen nachgewiesen werden. Daher wurden die hier isolierten Extrakte immunologisch mit Antikörpern gegen die  $\alpha$ -Untereinheit der PEP und einer NEP vom Phagentyp untersucht. Ebenso war es von Interesse, ob der in TAC-Extrakten gefundene Elongationsfaktor ETCHEDED1 in diesen Präparationen vorhanden ist. Der Antikörper gegen die  $\alpha$ -Untereinheit der PEP erkannte wie in TAC-Extrakten das 39 kD große Protein neben einigen offenbar unspezifisch markierten Proteinen (Abb. 30A). Das ET1-Protein ist dagegen nur im TAC-Extrakt nachweisbar (B). Selbst bei einer 20fach höheren Proteinmenge kann in der sRNAP-Fraktion kein Signal erhalten werden. Da auch keine 'cleavage'-Produkte in dieser Fraktion detektiert werden (3.3.8), ist ET1 hier wahrscheinlich nicht enthalten. Eine Analyse der sRNAP-Extrakte mit verschiedenen Antikörpern gegen eine NEP vom Phagentyp (2.20.1) ergab keine eindeutigen Ergebnisse (nicht gezeigt).

#### 3.4.2 Einfluß des DNA-'Templates' auf die Transkriptionsaktivität

Zur Bestimmung der Transkriptionsrate löslicher RNAP-Extrakte wurde grundsätzlich so verfahren wie mit TAC-Extrakten (2.21). Allerdings mußte im Transkriptionsansatz zusätzlich exogene DNA angeboten werden. Im sRNAP-Extrakt sind noch sehr geringe Spuren von DNA vorhanden (nicht gezeigt), von denen jedoch nur eine geringe Transkriptionsaktivität auszugehen scheint (Abb. 31). In früheren Untersuchungen wurde zur Messung der

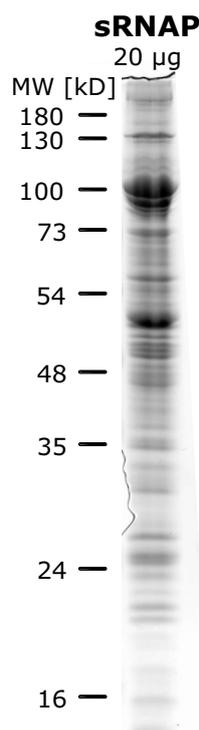


Abb. 29 : Proteinzusammensetzung von löslichen, transkriptionsaktiven Extrakten aus Maischloroplasten. 20  $\mu\text{g}$  Protein wurden in einem 12%igen SDS-Polyacrylamidgel gelelektrophoretisch aufgetrennt und anschließend mit Coomassie-Brillantblau angefärbt (2.18.1).

Aktivität meist Kalbsthymus-DNA eingesetzt. Auf diese Weise kann festgestellt werden, ob ein sRNAP-Extrakt transkriptionsaktiv ist. Um Aussagen über die Genspezifität treffen zu können, wurde in dieser Arbeit plastidäre DNA als 'Template' verwendet. Da es sich bei der isolierten Fraktion um eine lösliche RNAP-Fraktion aus Chloroplasten aus Mais handelte, wurde die Transkriptionsrate unter Zugabe angereicherter ptDNA aus Mais bestimmt. Der Vergleich der Aktivität der sRNAP nach Zugabe unterschiedlicher DNA-'Templates' war überraschend. Die Transkriptionsrate lag bei angebotener Plastiden-DNA ca. 3-4x über der Rate, die mit Kalbsthymus-DNA gemessen wurde. Durch dieses Ergebnis war die Voraussetzung gegeben, die Genspezifität der RNAPs in diesem Extrakt zu untersuchen. Die Spezifität für bestimmte Gene und deren Promotoren kann natürlich auch Hinweise auf die aktiven RNAPs in dieser Fraktion geben. Es ist noch anzumerken, daß die Synthese von RNA in dieser sRNAP-Fraktion im Gegensatz zu TAC-Extrakten auf einer Neuintiation von Transkripten beruht.

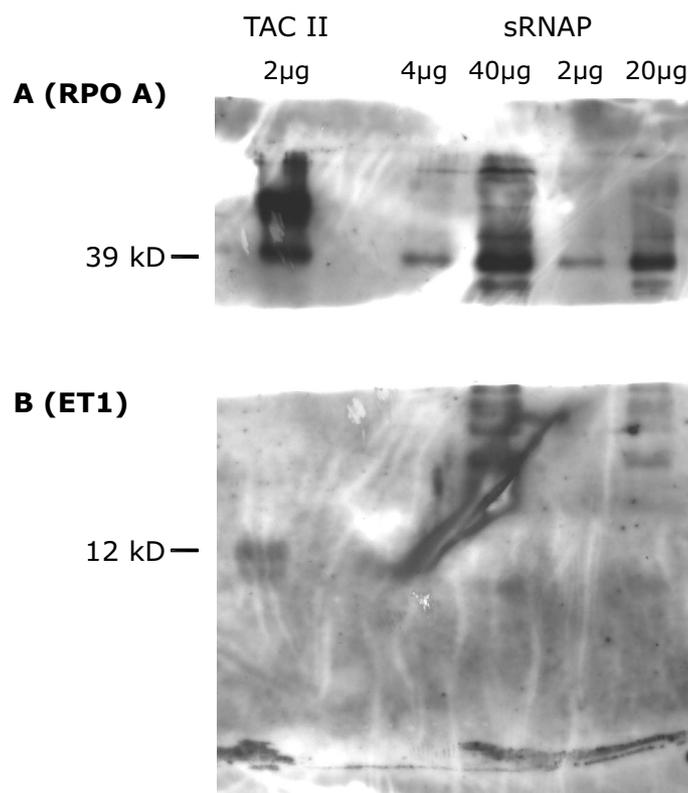


Abb. 30 : Immundetektion der  $\alpha$ -Untereinheit der PEP (RPO A) und des ET1-Proteins in sRNAP-Extrakten aus Mais. 2  $\mu$ g TAC II-Proteine aus Mais, sowie verschiedene Proteinmengen der sRNAP wurden in einem 16%igen 'High-Tris' Polyacrylamidgel ihrer Größe nach aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Membran wurde bei ca. 30 kD geteilt. Im höhermolekularen Bereich wurde die  $\alpha$ -Untereinheit der PEP, im niedermolekularen Bereich ET1 immundetektiert.

### 3.4.3 Genspezifität von sRNAP-Extrakten

Zur Untersuchung der Zusammensetzung der Transkripte, die von der sRNAP-Fraktion über Initiation an ptDNA synthetisiert werden, wurden die Transkripte während der Synthese radioaktiv markiert und mit DNA-'Dot-Blot'-Membranen hybridisiert, auf denen 22 plastidäre DNA-Fragmente immobilisiert worden waren (2.4). Das Autoradiogramm der Hybridisierung von Transkripte der sRNAP-Fraktion mit plastidären DNA-Fragmenten zeigte ein vollkommen anderes Bild als dies von 'run-on'-Experimenten mit Chloroplasten (KRAUSE *et al.*, 2000; KRUPINSKA und FALK, 1994) oder *in vitro*-Transkriptionsanalysen von TAC-Extrakten (3.3.6, FALK *et al.* (1993); KRAUSE (1999)) bekannt ist (Abb. 32). Es konnte abgeleitet werden, daß in der präparierten Fraktion noch eine geringe TAC-RNAP Aktivität vorhanden ist. Dies konnte bereits durch die Messung von Transkrip-

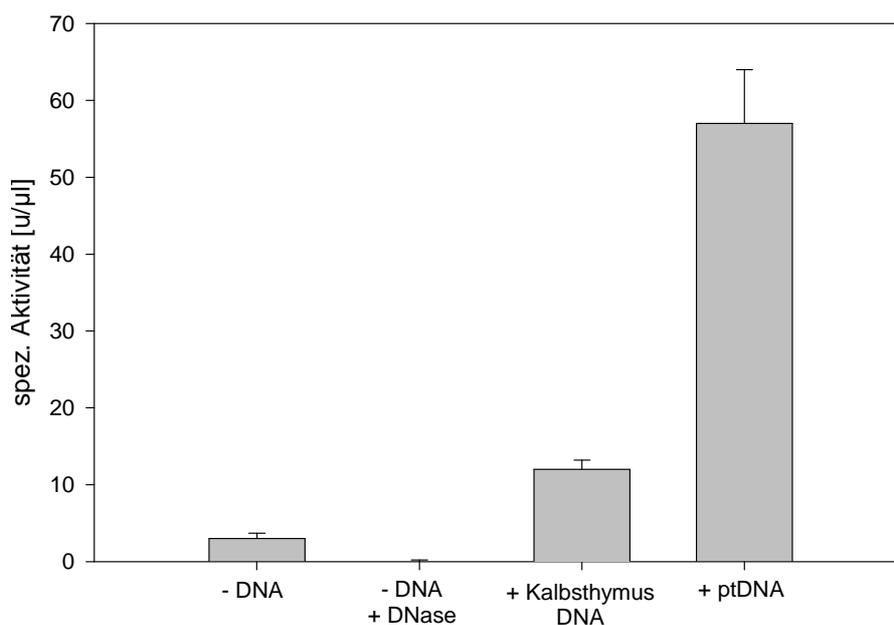


Abb. 31 : Bestimmung der Transkriptionsaktivität von sRNAP-Extrakten. Es wurde die Transkriptionsrate von jeweils 2  $\mu$ l eines sRNAP-Extraktes aus Maischloroplasten nach 2.21 ohne DNA und unter Verwendung verschiedener exogener DNA (Kalbsthymus-DNA bzw. ptDNA) gemessen. Zusätzlich erfolgte eine Messung nach einer 30minütigen Behandlung mit DNase (10 u, 30°C).

tionsaktivität ohne Zugabe exogener DNA vermutet werden und findet ihre Bestätigung in der Kontrollhybridisierung der erhaltenen Transkripte ohne Zugabe von DNA (sRNAP-DNA). Das Transkriptionsmuster ähnelt stark dem der TAC-RNAP (Abb. 25) und läßt den Schluß zu, daß diese Aktivität von TAC-Komplexen stammt. Weiterhin muß festgestellt werden, daß die Membranen, auf der Transkripte ohne die Zugabe von ptDNA hybridisiert wurden, erheblich länger exponiert werden mußten, um deutliche Signale für alle Genfragmente zu erhalten. Diese von der TAC-RNAP stammenden Signale sind zusätzlich zu den durch Neuintiation der sRNAP entstandenen Transkripte auch in dem Experiment mit ptDNA vorhanden. Berücksichtigt man die unterschiedlichen Expositionszeiten der Autoradiogramme, kann man für die ribosomalen Gene (rDNA), Gene für Transfer-RNAs (*trn*), sowie für *psbA* und *rbcL* keine durch Neuintiation synthetisierten Transkripte annehmen. Für die übrigen Gene ist eine zusätzliche Transkription durch die sRNAP-Aktivität feststellbar, die je nach Signalintensität tabellarisch angegeben ist (Abb. 32, sRNAP/TAC-RNAP). Beim Vergleich der beiden DNA-'Dot-Blot'-Membranen ist der herausragendste Unterschied bei den erhaltenen Signalen für die *rpo*-Gene erkennbar, die für die Unter-

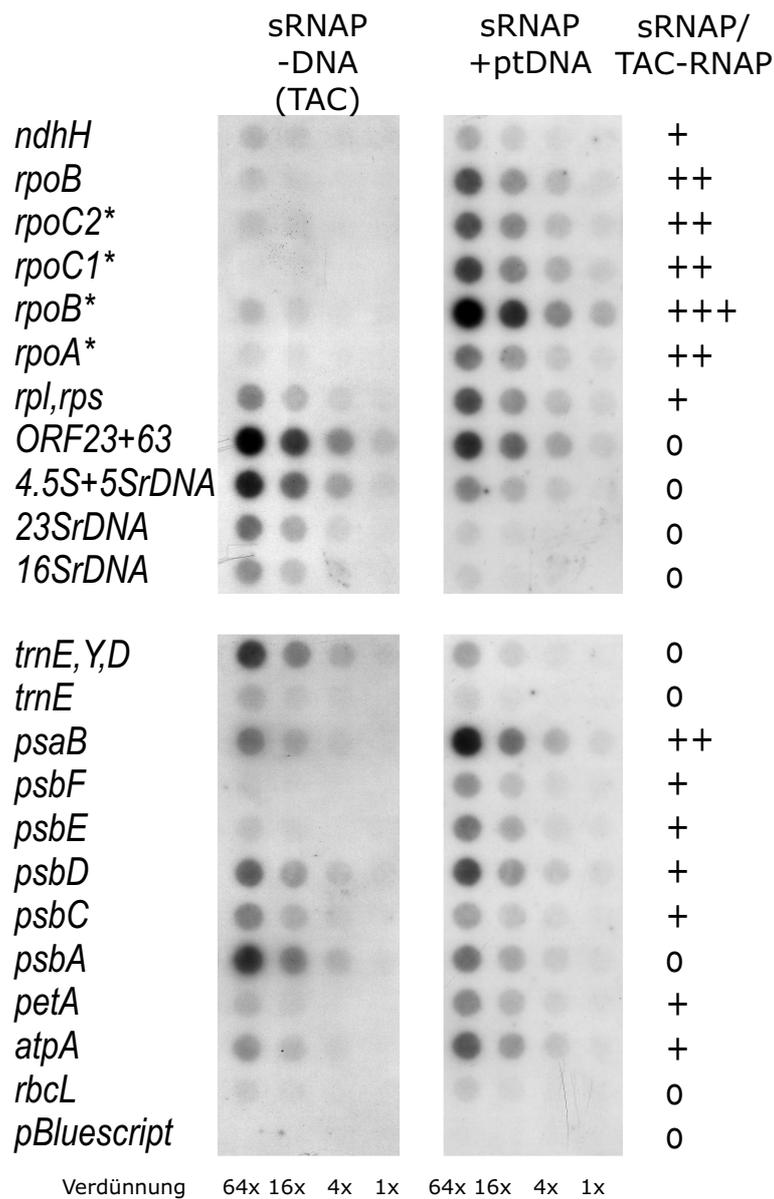


Abb. 32 : Autoradiogramme der Hybridisierung von *in vitro* Transkripten von sRNAP-Extrakten aus Mais. Zwei identische DNA-'Dot-blot'-Membranen, auf denen plastidäre Genfragmente aus Gerste oder Mais (\*) in verschiedenen Konzentrationen (1x bis 64x) immobilisiert worden sind, wurde mit radioaktiv markierter RNA hybridisiert, die aus zehnfachen Transkriptionsansätzen (2.21) mit und ohne Zugabe von ptDNA isoliert wurden. Es wurde jeweils die gesamte RNA für die Hybridisierung verwendet. Die Expositionszeit auf einem Röntgenfilm betrug für die ptDNA-haltige Probe 5 Tage, die Probe ohne externe DNA wurde für die Detektion von Signalen 3 Wochen exponiert. Auf der rechten Seite ist die relative Veränderung der Expression der einzelnen DNA-Fragmente durch die Zugabe von ptDNA angegeben.

einheiten der PEP kodieren. Das *rpoB/C1/C2*-Operon, das einen NEP-Promotor besitzt, wird durch die RNAP in dieser Fraktion am stärksten transkribiert. Die Erhöhung der

Transkriptmenge bei den Genen *ndhH*, *rpoA*, *rpl/rps*, *petA* und *atpA* ist aufgrund ihrer Promotoren vermutlich ebenfalls einer NEP-Aktivität zuzuschreiben. Des weiteren finden sich auch vermehrt Transkripte von Genen, die für Proteine des Photosyntheseapparates kodieren und die meist über einen PEP-Promotor verfügen. Hier ist vor allem die erhöhte Transkription von *psaB* hervorzuheben. Eine Steigerung der Transkription der Gene, die für Proteine des Photosystem II kodieren (*psb*-Gene) ist nur gering vorhanden.

#### 3.4.4 Einfluß von Hemmstoffen auf die Transkriptionsaktivität

Zur weiteren Differenzierung und Charakterisierung der Transkriptionsaktivität der sRNAP wurde diese unter Zugabe verschiedener Transkriptionshemmstoffe untersucht. Dabei kamen Hemmstoffe gegen die eubakterielle Transkription (Rifampicin), gegen die eukaryotische Aktivität der RNAP II ( $\alpha$ -Amanitin) und der unspezifische RNAP-Hemmstoff Actinomycin D zum Einsatz. Des weiteren wurde Tagetitoxin, ein Hemmstoff der nukleären RNAP III, der *E. coli*-RNAP und der verwandten PEP verwendet. Heparin fungiert als Kompetitor für die DNA-Bindung und wurde ebenfalls für Transkriptionsstudien eingesetzt. Wie zuvor gezeigt, war eine geringe Transkriptionsaktivität auch ohne Zugabe exogener DNA zu messen, die auf einer Restaktivität der TAC-RNAP basiert (Abb. 33). Methanol, das als Lösungsmittel für Rifampicin eingesetzt wurde, hatte keinen Einfluß auf die Transkriptionsaktivität. Rifampicin selbst hatte erst bei hohen Konzentrationen von 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  einen Effekt auf die Transkriptionsaktivität, was in Einklang mit den von LIERE und MALIGA (1999) veröffentlichten Daten steht. Heparin hat eine hohe Affinität zu DNA, kompetitiert mit RNAPs um dessen Bindung und verhindert eine Transkription. Actinomycin greift bereits bei der Initiation der RNA-Synthese ein und hemmt unspezifisch RNAPs. Die Transkription der sRNAP wird ebenfalls deutlich reduziert. Der Einsatz von  $\alpha$ -Amanitin hatte auch bei hohen Konzentrationen nur einen geringen Effekt auf die Transkriptionsaktivität der sRNAP und daher kann man ausschließen, daß Verunreinigungen durch die im eukaryotischen Zellkern vorliegende RNAP II vorhanden sind. Tagetitoxin hemmt überraschend die Aktivität der sRNAP. Während LIERE und MALIGA (1999) keine Hemmung der sRNAP-Aktivität oder einer T7-Phagen-Polymerase feststellen konnten, ist hier sowohl in der sRNAP als auch für eine T7-RNAP ein Effekt meßbar (3.2.2).

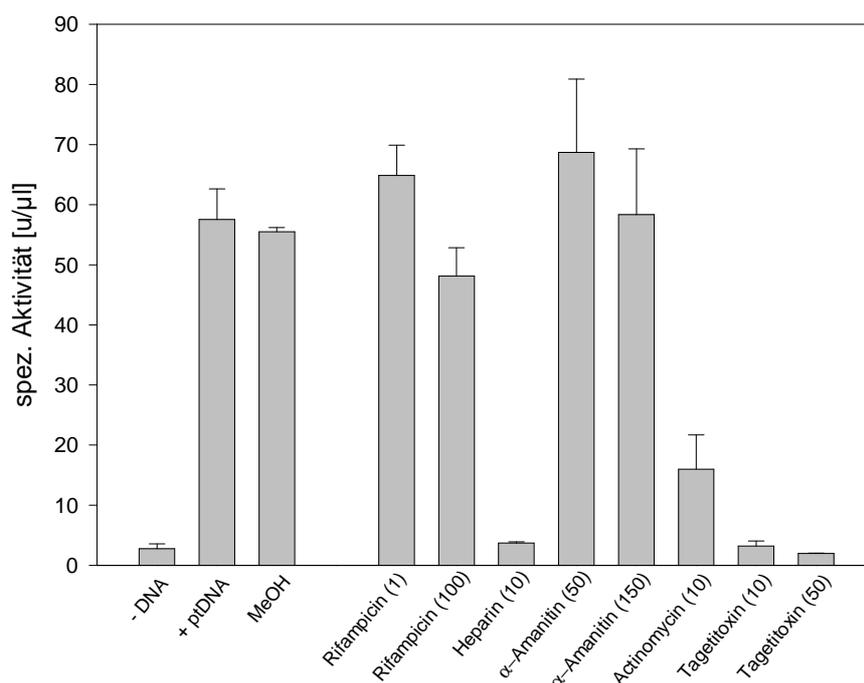


Abb. 33 : Transkriptionsaktivität der sRNAP unter Verwendung verschiedener Transkriptionshemmstoffe. Die spezifische Aktivität wurde nach einer 30minütigen Inkubation bei 30°C bestimmt. Die Konzentration der einzelnen Hemmstoffe ist jeweils in Klammern angegeben (in  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , Tagetitoxin:  $\mu\text{M}$ ). Bei allen Reaktionen wurde ptDNA verwendet.

### 3.4.5 Einfluß von Hemmstoffen auf die Genspezifität der sRNAP

Verschiedene Hemmstoffe haben einen unterschiedlichen Effekt auf die Aktivität der sRNAP. Ob dabei selektiv die Transkription einzelner Gene betroffen ist oder eine Reduktion der Transkriptionsrate auf einen generellen unspezifischen Rückgang der RNA-Synthese zurückzuführen ist, wurde mit Hilfe der Hybridisierung mit DNA-'Dot-Blot'-Membranen untersucht. Dabei wurde die Transkription wie in 3.4.3 durchgeführt, mit dem Unterschied, daß den Transkriptionsansätzen die Hemmstoffe Rifampicin ( $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) oder Tagetitoxin ( $50 \mu\text{M}$ ) beigemischt wurden. Das Transkriptionsmuster in Gegenwart von Rifampicin war, abgesehen von einer leichten generellen Abschwächung der Signale bei allen Genen, identisch zu dem erhaltenen Muster ohne den Hemmstoff (Abb. 32). Der Einsatz von Tagetitoxin führte zum kompletten Verlust der Transkriptionsaktivität, dementsprechend wurden hier keine Signale erhalten (nicht gezeigt).

### 3.4.6 Photoaffinitätsmarkierung von Proteinen

Die Photoaffinitätsmarkierung ist eine Methode zur Identifizierung von Proteinen, die während der Transkription in Kontakt mit der synthetisierten RNA stehen (2.22). Für TAC-Extrakte wurde eine solche Markierung bereits durchgeführt (KRAUSE, 1999; MÜLLER, 2000) und es konnten einige Proteine über eine sUTP-vermittelte Bindung an radioaktiv markierte RNA identifiziert werden. Über eine anschließende Immunpräzipitation konnte gezeigt werden, daß die  $\alpha$ -Untereinheit der PEP in einem solchen Experiment markiert wurde (KRAUSE, 1999). Es ist anzunehmen, daß unter anderem RNAPs mit dieser Methode detektiert werden können. Daher wurde dieses Experiment auch mit sRNAP-Extrakten durchgeführt. Das Muster der Markierungsprodukte der sRNAP-Extrakte unterscheidet

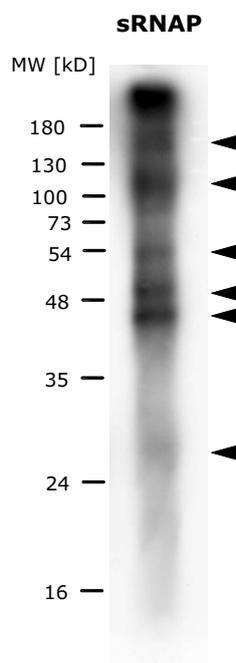


Abb. 34 : Autoradiogramm einer Photoaffinitätsmarkierung von sRNAP-Proteinen. 50  $\mu\text{g}$  Protein von sRNAP-Extrakten aus Maischloroplasten wurden in einem entsprechenden Reaktionsansatz (2.22.2) für 30 Min. bei 30°C unter Zugabe von 3,5  $\mu\text{g}$  ptDNA inkubiert. Anschließend erfolgte eine Auftrennung in einem 12%igem SDS-Polyacrylamidgel, ein Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran (2.19.2) und eine Exposition auf Röntgenfilm. Markierte Proteine sind durch Pfeile gekennzeichnet.

sich nur wenig von dem der TAC-Extrakte bei (KRAUSE, 1999). Während in der sRNAP vielfach große Proteine mit Molekulargewichten zwischen 40 und 150 kD markiert werden, konnten im TAC-Extrakt zusätzlich kleinere Proteine von unter 20 kD detektiert werden.

---

Eine Aussage über einzelne Proteine kann nicht getroffen werden. Aufgrund des Molekulargewichtes könnte es sich bei dem markierten Protein von 110 kD um eine NEP handeln. Geht davon aus, daß unter anderem die Untereinheiten von aktiven RNAPs markiert werden, scheinen in sRNAP-Extrakten ähnliche RNAPs wie bei der TAC-RNAP für den Großteil der Transkription verantwortlich zu sein. Dabei ist aber zu bedenken, daß auch Untereinheiten der TAC-RNAP in der untersuchten sRNAP-Fraktion markiert werden.

## 4 Diskussion

### 4.1 Zusammensetzung und Charakterisierung von 'Transkriptionsaktiven Chromosomen' aus Mais-, Gerste- und Spinat-chloroplasten

Es konnten TAC-RNAP-Komplexe aus Chloroplasten von Mais, Gerste und Spinat aufgereinigt werden. Ausgehend von dem von KRAUSE (1999) erarbeiteten Protokoll zur Isolierung hochangereicherter TAC-Extrakte aus Spinatblättern konnte diese Methode auch auf die beiden anderen Pflanzenarten übertragen werden. Für TAC-Extrakte aus Spinat war die Aufreinigung allerdings im Hinblick auf die relative Transkriptionsrate am effektivsten (Tab. 3). In der Proteinzusammensetzung unterscheiden sich die TAC-Extrakte dagegen kaum (Abb. 5).

Zur Verbesserung der Analyse von TAC-Extrakten wurde eine neue Methode der Proteinfällung etabliert. Vor einer gelelektrophoretischen Auftrennung von TAC-Proteinen müssen diese von der plastidären DNA befreit werden. Eine DNase-Behandlung reicht hier nicht aus, da der Proteinkomplex auch nach einer solchen Behandlung stabil bleibt und möglicherweise von der im Inneren befindlichen, für Nukleasen unzugänglichen DNA, zusammengehalten wird. Bei der bislang durchgeführten Phenolextraktion kam es zu einem erheblichen Verlust an Proteinen. Da im Normalfall nicht mehr als 2  $\mu\text{g}$  Protein für Analysen eingesetzt werden, kann dieser Verlust ein erhebliches Problem darstellen und dazu führen, daß einzelne Proteine mit den verwendeten Nachweismethoden nicht mehr detektierbar sind. Mit der von WESSEL und FLÜGGE (1984) beschriebenen Methode zur Entfernung von Lipiden und Detergenzien aus Proteingemischen wird eine weitaus bessere Proteinausbeute und Abtrennung von Nukleinsäuren erzielt (Abb. 6). Diese Chloroform/Methanol-Extraktion verringert nicht nur den Verlust von Proteinen, der bei jeglicher Art von Fällung zu verzeichnen ist, sondern stellt auch eine zeitsparende Alternative zur Phenolextraktion dar. Der Arbeitsaufwand von maximal 20 Minuten reduziert die Vorbereitungszeit für die Gelelektrophorese von TAC-Proteinen auf etwa ein Fünftel. Daher wurde für fast alle Experimente, die eine Abtrennung der ptDNA vom TAC erforderte, diese Methode gewählt.

Im Zuge der Aufreinigung wurde eine Gelfiltration durchgeführt (Abb. 3). Diese führte

bei KRAUSE (1999) zur Auftrennung zweier Transkriptionsaktivitäten im Säuleneluat, der TAC-Fraktion und einer nicht an die ptDNA gebundenen Transkriptionsaktivität. Diese zweite, lösliche transkriptionsaktive Fraktion konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht isoliert werden. Wenn man davon ausgeht, daß diese lösliche Fraktion durch die Freisetzung von Proteinen aus dem TAC entstanden ist (IGLOI und KÖSSEL, 1992), kam es möglicherweise bei (KRAUSE, 1999) unter den angegebenen Isolierungsbedingungen zu einer Dissoziation der RNAPs von der ptDNA. Immunologische Untersuchungen zeigten, daß die  $\alpha$ -Untereinheit der PEP bei der hier verwendeten Methode außerhalb des TAC-Eluates nicht von der Säule eluierte (MÜLLER, 2000). Lösliche RNAP-Fraktionen, die Untereinheiten der PEP enthalten, wurden meist über eine Gelfiltration nach Ammoniumsulfatfällung der löslichen Chloroplastenproteine (HU *et al.*, 1991; LERBS *et al.*, 1985; PFANNSCHMIDT *et al.*, 2000; TILLER und LINK, 1993) und nicht nach Anreicherung von Membranfraktionen isoliert. Es ist wenig wahrscheinlich, daß die Transkriptionsaktivität einer über Membrananreicherung gewonnenen löslichen RNAP-Fraktion von der PEP stammt, da die für die Transkription notwendige SLFs ebenfalls in dieser Fraktion vorliegen müssen. Selbst in einer über Affinitätschromatographie spezifisch angereicherten PEP-Fraktion aus Tabakchloroplasten fehlten diese SLFs (SUZUKI *et al.*, 2004). Dabei wurde die  $\alpha$ -Untereinheit der PEP mit einem C-terminalen Histidin-'Tag' versehen, und über Heparin- und Nickel-NTA-Säulen konnte ein aus ca. 30 Proteinen bestehender Komplex von etwa 900 kD isoliert werden. In diesem konnten über massenspektrometrische Analysen unter anderem alle Untereinheiten der PEP identifiziert werden. Weil jedoch die für die Promotorerkennung und Transkription notwendigen SLFs fehlten, wiesen diese Extrakte auch nach Zugabe von exogener DNA keine Transkriptionsaktivität auf. Erst durch den Zusatz von SLFs wurde eine Transkription induziert. Dazu wurden die beiden SLF-Proteine ZmSig2A und ZmSig2B (LAHIRI und ALLISON, 2000) aus Mais in *E. coli* überexprimiert und jeweils dem isolierten PEP-Extrakt zugegeben. Erst dann konnte das mit einem PEP-Promotor versehene plastidäre *psbA*-Gen *in vitro* transkribiert werden. Dies zeigt einerseits, daß die SLFs in Pflanzen offenbar universell austauschbar sind, andererseits scheint eine Anreicherung von PEP und SLFs nicht aneinander gekoppelt zu sein. Wenn bei TAC-Präparationen eine zweite, nicht an die ptDNA gebundene spezifische transkriptionsaktive Fraktion isoliert wird (KRAUSE, 1999), stammt die Transkriptionsaktivität wahrscheinlich von nukleär ko-

dierten RNAPs, die nicht auf spezielle Initiationsfaktoren angewiesen sind.

In TAC-Extrakten sind keine SLFs zu erwarten, denn hierbei handelt es sich um einen Elongationskomplex. Die TAC-RNAP verlängert lediglich *in vitro* die bereits *in vivo* initiierten Transkripte. Die Promotorerkennung und Transkriptinitiation sind bereits abgeschlossen und eine Neuinitiation findet nicht statt.

Welche Funktion haben nun die zahlreichen Proteine im TAC und welche von diesen sind tatsächlich auch *in vivo* Bestandteil des Elongationskomplexes und stellen keine unspezifisch angereicherten Proteine dar? Die zweidimensionale Auftrennung von TAC-Proteinen aus Spinat (Abb. 11) zeigte, daß sich noch weit mehr Proteine im TAC-Komplex befinden als bislang angenommen und über eindimensionale Gelelektrophorese abzuschätzen war. Mit der empfindlichen Fluoreszenzmarkierung von Proteinen war es möglich, bisher nicht nachweisbare Proteine zu detektieren. Es fand sich eine ganze Reihe von Proteinen, die offenbar nur in äußerst geringer Menge vorliegen und möglicherweise nicht über eine Silberfärbung sichtbar gemacht werden konnten. Die Anzahl der Proteine im TAC kann nun auf etwa 80-100 geschätzt werden, wobei einige davon aufgrund der erhaltenen Sequenzdaten (Tab. 4, Abb. 12) nichts mit der eigentlichen Funktion, der Transkriptelongation, zu tun haben. Es ist weiterhin zu bemerken, daß sich in einigen Fällen, in denen die eindimensionale Auftrennung nur ein Protein vermuten ließ, tatsächlich mehrere Proteine befinden. Die in geringer Menge vorliegenden Proteine könnten wichtige Faktoren des TAC darstellen. Für eine Identifizierung von Proteinen aus zweidimensional aufgetrennten TAC-Extrakten über Massenspektrometrie reichte die eingesetzte Proteinmenge aber nicht aus.

Neben den Untereinheiten der PEP konnte das ETCHED1-Protein als Bestandteil der TAC-RNAP identifiziert werden (Abb. 17,24,30). Dessen Funktion wird in einem späteren Abschnitt eingehend diskutiert (4.2). Daneben konnte das sogenannte TCP34-Protein immunologisch nachgewiesen werden (Abb. 16). Dessen TPR-Domäne legt eine Funktion bei der Transkriptregulation nahe. TCP34 wird in die Plastiden importiert und bindet spezifisch an plastidäre DNA (SOKOLENKO, A., unveröffentlicht). TPR-Proteine können die Stabilität der synthetisierten RNA beeinflussen (BOUDREAU *et al.*, 2000). Mbb1, ein nukleär kodiertes TPR-Protein wird ebenfalls in die Plastiden importiert und fungiert offenbar als Translationsregulator des *psbB/psbT/psbH*-Operons in *Chlamydomonas rein-*

*hardtii* (VAISTIJ *et al.*, 2000). Es gibt auch eine große Gruppe ähnlicher Proteine mit PPR- ('pentatricopeptid-repeat') Domänen, von denen angenommen wird, daß sie in die Transkription involviert sind (SMALL und PEETERS, 2000). Sie spielen eine essentielle Rolle bei der Organellenbiogenese, der Ribosomenakkumulation und der posttranskriptionellen Genregulation in Plastiden (LURIN *et al.*, 2004; NAKAMURA *et al.*, 2004; WILLIAMS und BARKIN, 2003; YAMAZAKI *et al.*, 2004). SUZUKI *et al.* (2004) konnten in der bereits erwähnten PEP-Präparation über Massenspektrometrie ein PPR-Protein von ca. 76 kD identifizieren. In TAC-Präparationen aus Senf wurde ebenfalls ein solches Protein nachgewiesen (PFALZ, 2004). Eine zweite Domäne von TCP34, ein 'helix-loop-helix' Motiv, ist ein charakteristischer Bestandteil DNA-bindender Transkriptionsfaktoren (KOHN *et al.*, 1997) und ist auch in anderen plastidären DNA-Bindeproteinen wie dem PEND-Proteinen vorhanden (NAKANO *et al.*, 1997; SATO *et al.*, 1998). Welche Rolle TCP34 in Plastiden und speziell im TAC spielt, ist noch nicht bekannt. TCP34 kann in Plastiden zudem in drei Formen vorliegen (SOKOLENKO, A., pers. Mitteilung), die sich aufgrund ihres Phosphorylierungszustandes und ihrer Lokalisation in Plastiden unterscheiden. In TAC-Extrakten liegt vermutlich eine thylakoidmembranassoziierte Form vor, die phosphorylierbar ist.

Im Gegensatz dazu scheint MFP1 nicht unmittelbar in Kontakt mit der TAC-RNAP zu stehen. Dieses Protein ist in Nukleoidfraktionen aus *A. thaliana* über Immundetektion nachgewiesen worden (JEON *et al.*, 2003). MFP1 besitzt eine DNA-Bindeaktivität über eine 'coiled-coil'-Struktur (vergleichbar mit der des bakteriellen Transkriptionsfaktors GreB). Computergestützte Lokalisationsanalysen weisen auf eine Plastidenlokalisierung hin. Durch Fraktionierung von Plastiden konnte eine Assoziation an die Thylakoidmembran nachgewiesen werden. Allerdings kann es auch im Zellkern detektiert werden und verfügt über eine NLS- ('nuclear localization signal') Domäne. Es ist möglich, daß MFP1 über eine doppelte zelluläre Adresse verfügt (MEIER *et al.*, 1996; JEON *et al.*, 2003). In den in dieser Arbeit aufgereinigten TAC-Extrakten konnte MFP1 jedoch nicht detektiert werden (Abb. 15).

Neben 'Western-Blot'-Analysen wurde versucht, über den Einsatz von Antikörpern in Transkriptions-'Assays' eine direkte Beteiligung einzelner Proteine an der RNA-Synthese zu untersuchen. Keiner der verwendeten Antikörper, die gegen TAC-Proteine spezifisch

sind, auch nicht ein Antikörper gegen die  $\beta$ -Untereinheit der PEP, beeinflusste die Transkription der TAC-RNAP (Abb. 18). Beim TAC handelt es sich offenbar um einen sehr kompakten Komplex. Schon das verwendete Aufreinigungsverfahren über mehrere Gelfiltrationen weist auf die hohe Stabilität des TAC hin. Antikörper können vermutlich nicht in das Innere dieses Komplexes gelangen und spezifisch an Proteine binden und sie damit in ihrer Funktion beeinflussen. Lediglich der Antikörper gegen die große Untereinheit der RuBisCO zeigte eine dosisabhängige Hemmung der Transkription. Da sich dieses Protein aber nicht im TAC befindet (SUCK, 1996), bindet der Antikörper möglicherweise eine antigene Domäne eines anderen Proteins. Obwohl es sich um eine unspezifische Bindung handelt, könnte über diesen Antikörper eine Anreicherung von Proteinen des TAC erfolgen.

Befunde anderer Arbeitsgruppen geben Hinweise auf weitere mit der TAC-RNAP assoziierte Proteine und deren Funktion. Diese wurden meist bei der Isolierung von Nukleoiden identifiziert oder durch eine Kolo-kalisation mit diesen in Zusammenhang mit der plastidären Transkription gebracht. Nukleotide sind DNA-reiche Regionen in Plastiden, in denen viele Kopien der ptDNA kondensiert vorliegen (KUROIWA, 1991). Ein Protein, welches aus der Sojabohne extrahiert wurde, scheint in diesen Prozess involviert zu sein. DCP68 ('DNA compacting protein of 68 kD', CANNON *et al.* (1999)) kann DNA *in vitro* kondensieren und verhindert die Replikation der ptDNA. Daneben fungiert dieses Protein auch als Sulfitreduktase und ist an der Biosynthese schwefelhaltiger Aminosäuren beteiligt (CHI-HAM *et al.*, 2002). Da es sowohl in Zellkulturen der Sojabohne als auch in jungen Erbsenpflanzen gefunden wurde, ist es offenbar ein genereller Bestandteil von Nukleoiden und damit wahrscheinlich auch des TAC. Eine rekombinant hergestellte Sulfitreduktase (SiR) aus Mais kann ebenfalls DNA kondensieren (SATO *et al.*, 2001). Dieses 70 kD Protein kolokalisiert ebenfalls mit den Nukleoiden und hemmt deren Transkriptionsaktivität (SEKINE *et al.*, 2002). Interessant hierbei ist, daß es dabei als Gegenspieler zu Heparin agiert. Heparin erhöht die Transkriptionsaktivität in Nukleoiden erheblich, wobei es wahrscheinlich beim Dekondensieren der DNA eine Rolle spielt. Im TAC wird die Transkription durch entsprechende Konzentrationen an Heparin nicht beeinflusst (KRAUSE und KRUPINSKA, 2000). Die Empfindlichkeit gegenüber Transkriptionshemmstoffen ist ansonsten aber in Nukleoiden und TAC-Extrakten identisch (KRAUSE und KRUPINSKA, 2000; SEKINE *et al.*, 2002).

Es wird angenommen, daß die Organisation der Nukleotide über histonähnliche Proteine reguliert wird. So wurden in Spinat (BRIAT *et al.*, 1984), Erbse (YURINA *et al.*, 1995) und verschiedenen Algen Proteine gefunden, die eine geringe Ähnlichkeit zu dem mit Histonen verwandten Protein HU aus *E. coli* besitzen. Ein derartiges Protein, welches aus der Rotalge *Cyanidioschyzon merolae* isoliert worden ist, ist in der Lage, DNA zu kondensieren und kann eine HU-defiziente *E. coli*-Mutante komplementieren. Allerdings konnte bislang kein Gen, welches für ein zu HU homologes Protein kodiert, im Genom Höherer Pflanzen gefunden werden (KOBAYASHI *et al.*, 2002). Nukleotide und auch TAC-Extrakte sind mit ihren negativ geladenen DNA-Komplexen ohnehin sehr anfällig gegenüber Kontaminationen durch basische Proteine anderer Kompartimente. Dies erklärt auch die Befunde, daß in TAC-Fractionen aus Gerste (SUCK, 1996), Spinat (KRAUSE, 1999), Senf und *A. thaliana* (PFALZ, 2004) nukleäre Histone gefunden wurden.

Weitere Proteine, die in Nukleotiden gefunden wurden und auch in TAC-Extrakten vorhanden sein können, sind CND41 ('chloroplast nucleoid DNA binding protein') oder CDF2 ('chloroplast DNA binding factor 2'). CND41 unterdrückt die Expression plastidärer Gene und weist eine Proteaseaktivität auf (MURAKAMI *et al.*, 2000), CDF2 scheint bei der Regulation des *rrn*-Operons sogar mit mehreren RNAPs zusammenzuarbeiten und die Genexpression zu beeinflussen (BLIGNY *et al.*, 2000).

Das sogenannte PEND- ('plastid envelope DNA binding') Protein ist ebenfalls ein möglicher Bestandteil 'Transkriptionsaktiver Chromosomen'. Nukleotide und TAC-Komplexe sind mit der Thylakoidmembran assoziiert oder in ihr verankert. Das PEND-Protein ist möglicherweise ein solcher Membrananker. Es ist in Proplastiden an der Plastidenmembran lokalisiert und bindet über eine Leucin-Zipper-Domäne spezifisch an ptDNA (SATO *et al.*, 1998; SATO und OHTA, 2001). Ein mit Annexin verwandtes Protein, welches ebenfalls als Membrananker fungieren könnte, wurde in einem transkriptionsaktiven Plastidenextrakt aus Senf identifiziert (PFANNSCHMIDT *et al.*, 2000). In dieser gegenüber Rifampicin resistenten Fraktion wurden über MALDI-TOF/MS Analyse neben den PEP-Untereinheiten  $\beta$  und  $\beta''$  ein RNA-Bindeprotein von 36 kD und eine Superoxid-Dismutase von 26 kD gefunden. Auch diese beiden Proteine können im TAC-Komplex vorhanden sein, denn die neu synthetisierte RNA muß stabilisiert werden. Die Membranassoziation des TAC und

die räumliche Nähe zu Reaktionen, die photooxidative Schädigungen hervorrufen können, macht die Anwesenheit eines antioxidativ aktiven Enzyms sinnvoll. Es ist allerdings anzumerken, daß keines der von PFANNSCHMIDT *et al.* (2000) identifizierten Proteine in der PEP-Präparation von SUZUKI *et al.* (2004) nachgewiesen werden konnte, in der neben den PEP-Untereinheiten acht weitere Proteine über MALDI-TOF/MS identifiziert wurden. Neben dem bereits erwähnten Protein mit einer PPR-Domäne scheinen hier zwei weitere Proteine mit der PEP-Aktivität in Zusammenhang zu stehen. Ein Protein von 100 kD besitzt ein SAP Motiv, das in die Chromatinbindung involviert sein kann (ARAVIND und KOONIN, 2000), ein zweites von 75 kD besitzt eine S1-Domäne, die auf eine Beteiligung bei der RNA-Prozessierung oder Translation hindeutet (BYCROFT *et al.*, 1997). Die übrigen identifizierten Proteine haben keine Funktion, die mit der Transkription in Zusammenhang gebracht werden könnte.

Eigene Sequenzanalysen im Rahmen dieser Arbeit gaben nur keine eindeutigen Hinweise auf Proteine, von denen man annehmen kann, daß sie in die Transkriptionsmaschinerie der Plastiden involviert sind (Abb. 12, Tab. 4). Untereinheiten der ATP-Synthase scheinen nicht von der TAC-RNAP abtrennbar zu sein. Sie wurden schon in vorangegangenen Arbeiten über Sequenzanalyse oder Immundetektion in TAC-Extrakten nachgewiesen (KRAUSE, 1999; SUCK, 1996). Ebenso scheint eine Verunreinigung mit Histonen aus dem Zellkern oder mit weiteren thylakoidmembranassoziierten Proteinen wie dem Chlorophyll a/b Bindeprotein kaum vermeidbar zu sein. Einzelne ribosomale Untereinheiten sind hingegen durchaus als transiente Bestandteile am TAC-Komplex denkbar. Es ist möglich, daß bereits kurz nach der RNA-Synthese die Bindung an die Ribosomen und der Beginn der Translation stattfindet.

Darüber hinaus wurden mehrere Proteine mit Zinkfingerdomänen identifiziert. Diese meist im Zellkern lokalisierten Proteine können Nukleinsäuren binden. Ob die im TAC gefundenen Proteine plastidenspezifisch sind oder wie Histone während der TAC-Präparation mit aufgereinigt wurden, kann bislang nicht abgeschätzt werden. Die übrigen erhaltenen Peptidsequenzen sind Proteinen zuzuordnen, die nicht unmittelbar mit der Transkription in Zusammenhang stehen (Tab. 4).

Neben Untersuchungen zur direkten Identifizierung von Proteinen in TAC-Extrakten, wurde überprüft, ob sich in TAC-Extrakten eine Proteinkinase befindet und ob diese einen Einfluß auf die Transkriptionsaktivität der TAC-RNAP hat. Tatsächlich wurden einige Proteine nach Zugabe einer exogenen Proteinkinase phosphoryliert, eine endogene Phosphorylierungsaktivität konnte jedoch nicht festgestellt werden (Abb. 10). In keiner der vier untersuchten TAC-Präparationen wurde im Unterschied zu der TAC-Präparation von KRAUSE (1999), bei der Proteine von 15, 29 und 54 kD markiert wurden, Proteine durch eine endogene Kinaseaktivität im TAC phosphoryliert. Auch Untersuchungen an löslichen RNAP-Fraktionen zeigten eine Regulation der Genexpression durch Phosphorylierung von Proteinen (BAGINSKY *et al.*, 1997, 1999; TILLER und LINK, 1993). Die von BAGINSKY *et al.* (1997) mit der RNAP-Aktivität verbundene Serin-spezifische Proteinkinase (PTK, 'plastidäre Proteinkinase') soll bei der Phosphorylierung von SLFs eine Rolle spielen. Da aber nicht davon ausgegangen werden kann, daß sich diese Initiationsfaktoren noch im TAC-Komplex befinden, scheint auch eine Anwesenheit dieser Proteinkinase in TAC-Extrakten nicht notwendig. Wie die vorliegenden Ergebnisse zeigen, ist die Transkriptionsaktivität der TAC-RNAP nicht von der Phosphorylierung einzelner Proteine während des Elongationsprozesses abhängig. Ob eine exogene Kinase die spezifische Expression einzelner Gene beeinflussen kann, wurde nicht untersucht.

Eine entscheidende Frage im Zusammenhang mit der Transkriptionsaktivität von TAC-Extrakten ist weiterhin, welche RNAPs hier tatsächlich aktiv sind. Da sich keine Unterschiede im Transkriptionsmuster intakter Chloroplasten in 'run-on'-Experimenten und der TAC-RNAP normaler sowie PEP-defizienter Gerste zeigen (FALK *et al.*, 1993; KRAUSE und KRUPINSKA, 2000), sind wahrscheinlich sowohl PEP als auch NEP im TAC vorhanden. Auch transgene Tabakpflanzen, denen einzelne Untereinheiten der PEP fehlen, sind in der Lage, das gesamte Plastom zu transkribieren (KRAUSE *et al.*, 2000; LEGEN *et al.*, 2002). Eine Beteiligung der PEP an der Transkriptionsaktivität im TAC ist durch den immunologischen Nachweis einzelner Untereinheiten hinreichend belegt. Eine nukleär kodierte RNAP vom Phagentyp konnte in TAC-Extrakten immunologisch nicht nachgewiesen werden (Abb. 14). Der Nachweis von NEPs vom Phagentyp mittels Antikörper in Plastiden erfolgte bislang nur über einen ALPA ('antibody-linked polymerase assay', BLIGNY *et al.*

(2000)). Überraschenderweise konnten CAHOON *et al.* (2004) *rpoT*-Genprodukte sogar in Gesamtproteinextrakten aus Maischloroplasten nachweisen, wobei derselbe Antikörper wie in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde.

Bei der Untersuchung des bereits erwähnten Faktors CDF2 konnte zudem noch eine dritte RNAP-Aktivität nachgewiesen werden, die weder der PEP noch der bereits bekannten 'NEP1'-RNAP vom Phagentyp von 110 kD zuzuordnen war (BLIGNY *et al.*, 2000; LERBSMACHE, 1993) und daher als 'NEP2' bezeichnet wurde. Eine genauere Charakterisierung dieser RNAP wurde bislang nicht durchgeführt.

Auch die Untersuchung der Transkriptionsaktivität der TAC-RNAP bezüglich ihrer Empfindlichkeit gegenüber Hemmstoffen konnte in bezug auf die Beteiligung von NEPs keine weiteren Hinweise liefern. Die TAC-RNAP ist unempfindlich gegenüber Rifampicin (Abb. 8), was auch bereits von KRAUSE und KRUPINSKA (2000) gezeigt wurde und von Nukleoiden ebenfalls bekannt ist (SAKAI *et al.*, 1998; SEKINE *et al.*, 2002). Rifampicin blockiert die Transkription bereits in der Phase der Initiation. Bereits nach der Synthese von zwei bis drei Nukleotiden bindet der Hemmstoff an der  $\beta$ -Untereinheit der RNAP von *E. coli* und verhindert die RNA-Synthese (CAMPBELL *et al.*, 2001). Dies geschieht also bevor die RNAP in die eigentliche Elongationsphase übergeht. TAC-Komplexe befinden sich bereits in dieser, so daß eine Hemmung auch nicht zu erwarten ist. Unterschiedliche Ergebnisse wurden im Hinblick auf die Sensitivität gegenüber Tagetitoxin erhalten. Während in dieser Arbeit eine starke Hemmung der TAC-RNAP durch Tagetitoxin zu beobachten war, zeigte sich bei KRAUSE und KRUPINSKA (2000) nur eine Reduktion der Transkriptionsaktivität um etwa 50 %. Bei Nukleoiden, die aus Chloroplasten von Erbse und Mais isoliert wurden, zeigte sich aber ebenfalls eine Reduktion der Transkriptionsrate um über 95 % (SEKINE *et al.*, 2002), solche aus Proplastiden wurden hingegen nur zu etwa 50 % gehemmt (SAKAI *et al.*, 1998). Von Proplastiden wird angenommen, daß hier die NEP noch stärker aktiv ist als die PEP, die erst in photosynthetisch aktivem Gewebe verstärkt zum Einsatz kommen soll (LIERE und MALIGA, 2001).

Prinzipiell muß davon ausgegangen werden, daß sich grundsätzlich eine NEP, ob nun phagenähnlich oder nicht, im TAC-Komplex befindet.

## 4.2 Charakterisierung des ETCHED1-Proteins

### 4.2.1 Nachweis von ETCHED1 im TAC

In TAC-Fractionen konnte mittels Immundetektion das ETCHED1-Protein detektiert werden. Es beeinflusst in Mais zwei verschiedene Stadien in der Entwicklung der Pflanze (GARG, 2002). Das Fehlen des *et1*-Gens verursacht zum einen einen reduzierten Stärkegehalt in den Körnern (SANGEETHA und REDDY, 1991) und die Bildung von Furchen und Rissen aufgrund einer abnormalen Entwicklung der Aleuronschicht sowie des Endosperms (AHREND, 1998; GARG, 2002). Zum anderen zeigen junge Sämlinge vireszente Blätter in den ersten Tagen nach der Keimung. Die fahlgrünen bis albinotischen Blätter besitzen einen reduzierten Chlorophyllgehalt (RAMESH *et al.*, 1984) und die Plastidenentwicklung ist verzögert (SANGEETHA *et al.*, 1986). Die Keimlinge sind jedoch nach ca. 10-15 Tagen vollständig ergrünt (Abb. 19).

Anhand der aus der cDNA abgeleiteten Aminosäuresequenz von ET1 wurde ein Peptidantikörper hergestellt. Das für die Herstellung des Antikörpers verwendete Peptid umfaßt nicht die hochkonservierte 'zinc ribbon'-Domäne, die ein vielfach bekanntes Motiv in Transkriptionsfaktoren der Archaeobakterien und Eukaryoten darstellt und für eine ganze Reihe nukleinsäurebindender Proteine typisch ist (CHEN *et al.*, 2000). Für die Herstellung eines Antikörpers gegen ET1 wurde eine spezifische Sequenz im Bereich der Prozessierungsstelle außerhalb dieser konservierten Domäne ausgewählt, so daß eine Detektion des reifen und des unprozessierten Proteins möglich ist. Das ET1-Protein hat eine Länge von 163 Aminosäuren bei einem Molekulargewicht von 19,6 kD. Nach Abtrennung der N-terminalen Transitsequenz für die Plastiden ergibt sich für das reife Protein eine Länge von 99 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 11,9 kD. An isolierten Chloroplasten aus Spinat konnte gezeigt werden, daß das *in vitro* translatierte ET1 über den allgemeinen Importweg (SOLL und TIEN, 1998) in das Stroma transloziert wird (DA COSTA E SILVA *et al.*, 2004). Dabei hatte das importierte Protein ein Molekulargewicht von ca. 12 kD. In TAC-Extrakten aus Spinat und Mais konnte mit dem für ET1 spezifischen Antikörper ein Protein von 12 kD detektiert werden (Abb. 17,24). Da das Signal in TAC II-Extrakten stärker war als in TAC I-Extrakten, wurde ET1 offensichtlich mit der Transkriptionsaktivität angereichert. Die spezifische Anreicherung dieses Proteins im Zuge der TAC-Aufreinigung deutet darauf hin, daß ET1 eine Rolle bei der plastidären Transkription spielen könnte. Um auszuschlies-

sen, daß der Antikörper ein anderes Protein unspezifisch markierte, wurde das *et1*-Gen über ein *in vitro*-Transkriptions- und Translationssystem in das entsprechende Protein überschrieben. Es ist bislang nicht gelungen, das ET1-Protein überzuexprimieren und es in ausreichender Menge *in vitro* herzustellen, um es über 'Western-Blot'-Analyse nachzuweisen. Daher wurde ET1 während der Translation mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin und  $^{35}\text{S}$ -Cystein radioaktiv markiert und mit dem Peptidantikörper immunpräzipitiert. Hierbei wurde das komplette *et1*-Gen eingesetzt und dementsprechend ein Protein von 19 kD gefällt (Abb. 21). Das Ergebnis zeigt, daß es sich bei dem in TAC-Extrakten immundetektierten Protein von 12 kD um das ET1-Protein handelt. Es liegt sowohl in Mais als auch Spinat vor, für Spinat konnte aber bislang noch kein *et1*-homologes Gen in den Datenbanken gefunden werden. In TAC-Extrakten aus Gerste konnte kein Signal für ET1 erhalten werden (nicht gezeigt). Dieser Umstand ist nicht verwunderlich, denn die bekannte Sequenz des homologen Gens *Hvzr1* weist lediglich im Bereich der hochkonservierten 'zinc-ribbon' Domäne eine hohe Ähnlichkeit zu *et1* aus Mais auf. Die aus der DNA-Sequenz abgeleitete Aminosäuresequenz des Gerstengens beinhaltet keinen Bereich, der mit dem für die Antikörperherstellung verwendeten Peptids übereinstimmt. Dies trifft auch auf alle übrigen bekannten Vertreter der ZR-Proteine zu (s. Anhang).

Die Identifizierung von ET1 im TAC warf die Frage nach der Funktion dieses Proteins auf. Zunächst war es im Hinblick auf die Anreicherung des Proteins mit der Transkriptionsaktivität der TAC-RNAP von besonderem Interesse zu klären, ob es eventuell direkt Einfluß auf die Transkription hat. Die Charakterisierung einer Deletionsmutante der Modellpflanze *A. thaliana*, in der das *et1*-homologe Gen *Atzr1* mutiert ist, konnte bei der Untersuchung von ET1 nicht vorgenommen werden. Pflanzen, die im Hinblick auf eine Mutation von *Atzr1* homozygot sind, keimen zwar, stellen dann jedoch das Wachstum ein und ergrünen nicht (LORBIECKE, R., pers. Mitteilung). Eine Anzucht auf einem zuckerhaltigen Medium ist ebenfalls nicht möglich. Das Fehlen des von *Atzr1* kodierten Proteins verursacht anscheinend nicht behebbare Defekte und läßt auf eine essentielle Funktion dieses Proteins schließen. Bei der Untersuchung von ET1 war es von Vorteil, daß es in Mais eine Genduplikation von *et1* gibt. Das Protein des als *Zmzr1* bezeichneten Gens wird ebenfalls in die Plastiden importiert. Das Fehlen dieses zweiten Gens wäre für Maispflanzen vermutlich ebenfalls letal. *Zmzr1* kann *et1* aber nicht adäquat ersetzen, was die Ausprägung des bereits

beschriebenen Phänotyps der *et1-R*-Mutante klar aufzeigt. Es war aber möglich, Pflanzen einer solchen Linie anzuziehen und TAC-Extrakte daraus zu isolieren. Da es schwierig ist, keimungsfähige Körner von solchen Mutanten in größerer Menge zu produzieren, wurden Chloroplasten aus mehreren Wochen alten Pflanzen isoliert, die keinen starken Phänotyp mehr zeigten, um zumindest ein Zehntel (100 g) der üblicherweise verwendeten Menge an Blattmaterial für die TAC-Präparation zur Verfügung zu haben. Aus diesem Material konnte erfolgreich eine TAC-Fraktion isoliert und analysiert werden. Vergleicht man die Proteinmuster der TAC-Extrakte (TAC I bzw. TAC II) aus Wildtyp Mais und der ET1-defizienten Linie *et1-R* miteinander, so lassen sich keine Unterschiede feststellen (Abb. 23). Offenbar hat das Fehlen von ET1 keinen Einfluß auf die Assemblierung des TAC-Komplexes. Dementsprechend war auch bei der immunologischen Analyse der Extrakte kein Unterschied festzustellen (Abb. 24). ET1 war nur im Wildtyp deutlich nachweisbar. Die  $\alpha$ -Untereinheit der PEP fand sich in beiden TAC-Präparationen. Auffällig ist hier die unterschiedliche Signalintensität der einzelnen Fraktionen. Es läßt sich keine Abhängigkeit zwischen der Signalstärke des *rpoA*-Genproduktes und der aufgetragenen Transkriptionsaktivität feststellen.

Bei der immunologischen Analyse der TAC-Proteine aus Mais ist außerdem darauf hinzuweisen, daß die Mengen gleicher Transkriptionsaktivitäten des Wildtyps und der Mutante, die für 'Western-Blot'-Analysen eingesetzt wurden, nicht gleiche Proteinmengen aufwiesen. Untersucht man die spezifische Transkriptionsaktivität beider Extrakte, so war in bezug auf die Proteinmenge eine deutliche Reduktion in der Mutante zu verzeichnen (Abb. 22). Die spezifische Aktivität betrug hier nur ca. 30 % im Vergleich zum Wildtyp. Diese Reduktion hat aber keine qualitative Auswirkung auf die Transkription einzelner Gene durch die TAC-RNAP. Bei der Hybridisierung von TAC-Transkripten mit plastidenspezifischen Gensonden zeigte sich bei beiden Linien das gleiche Transkriptionsmuster (Abb. 25). Möglicherweise kann in diesem Entwicklungsstadium die Defizienz an ET1 durch das homologe *ZmZR1* in gewissen Maße ausgeglichen werden. Es ist auch denkbar, dass ET1 im Laufe der Entwicklung durch *ZmZR2* ersetzt werden kann. Die gegenläufige Expression der plastidären *zr*-Gene in Gerste legt eine solche Vermutung nahe. Während *Hvzr1* in jungem Gewebe einen hohen Transkriptgehalt aufweist, der im Laufe der Entwicklung abnimmt, zeigt *Hvzr2* in ausdifferenziertem Gewebe den höchsten Transkriptgehalt (Abb. 28).

### 4.2.2 Funktion des ETCHED1-Proteins im TAC

Datenbankrecherchen zeigten, daß die Sequenz von ET1 eine signifikante Homologie zu der 'zinc-ribbon' (ZR)-Domäne des eukaryotischen Transkriptionsfaktors TFIIS aufweist. Die ZR-Domäne von TFIIS ist durch ein dreisträngiges  $\beta$ -Faltblatt, welches vier Cysteinreste mit einem zentralen Zinkatom und eine 'hairpin'-Struktur mit zwei sauren Aminosäureresten enthält, gekennzeichnet. ET1 verfügt über eine ähnliche Struktur mit vier Cysteinresten und einer der beiden sauren Aminosäuren, die essentiell für die Aktivität von TFIIS sind (Abb. 20, DA COSTA E SILVA *et al.* (2004); JEON *et al.* (1994); KETTENBERGER *et al.* (2003)). Eine derartige ZR-Domäne ist auch im Transkriptionsfaktor TFIIB zu finden (HAHN und ROBERTS, 2000).

TFIIS wurde als erster Transkriptionsfaktor der RNAP II bereits 1976 isoliert (SEKIMIZU *et al.*, 1976). Als Elongations- und Fehlerkorrekturfaktor induziert TFIIS die Spaltung von mRNA, indem die ansonsten sehr schwache intrinsische Nukleaseaktivität der RNAP II aktiviert wird (IZBAN und LUSE, 1992; REINES, 1992). Diese Nukleaseaktivität ist allen RNAPs eigen und stellt die reverse Reaktion zur RNA-Polymerisation dar, und spielt dann eine Rolle, wenn die RNAP durch verschiedene Ereignisse blockiert wird (ERIE, 2002; SHILHATIFARD *et al.*, 2003). In einem solchen Fall bewegt sich die RNAP relativ zur DNA und der naszierenden RNA rückwärts. Dieses sogenannte 'backtracking' führt dazu, daß das 3'-Ende des Transkriptes nicht mehr in Kontakt mit dem katalytischen Zentrum der RNAP steht. Die RNAPs können dann nur durch eine endonukleolytische Abspaltung des zuletzt synthetisierten RNA-Stückes reaktiviert werden und die Elongation fortsetzen. Diese Abspaltung ('cleavage'-Reaktion) kann durch zusätzliche Faktoren induziert und verstärkt werden. Der Mechanismus bleibt jedoch unabhängig von einem gebundenen Faktor derselbe. Im Fall der RNAP II ist der verstärkende Faktor TFIIS. In Eubakterien gibt es mit GreA und GreB ebenfalls Faktoren, die dort die gleiche Reaktion induzieren können. Der Mechanismus, wie Elongationsfaktoren wie TFIIS mit der TAC-RNAP interagieren, ist schematisch in Abb. 35 dargestellt.

Die Ähnlichkeit der Sequenz von ET1 zu der funktionellen Domäne von TFIIS legt die Vermutung nahe, daß beide Proteine eine ähnliche Funktion ausüben. Daher wurde die Nukleasekapazität der TAC-RNAP untersucht und ihre Abhängigkeit von ET1 analysiert. Die Transkription wurde durch Zugabe eines modifizierten Ribonukleotids zum Arrest ge-

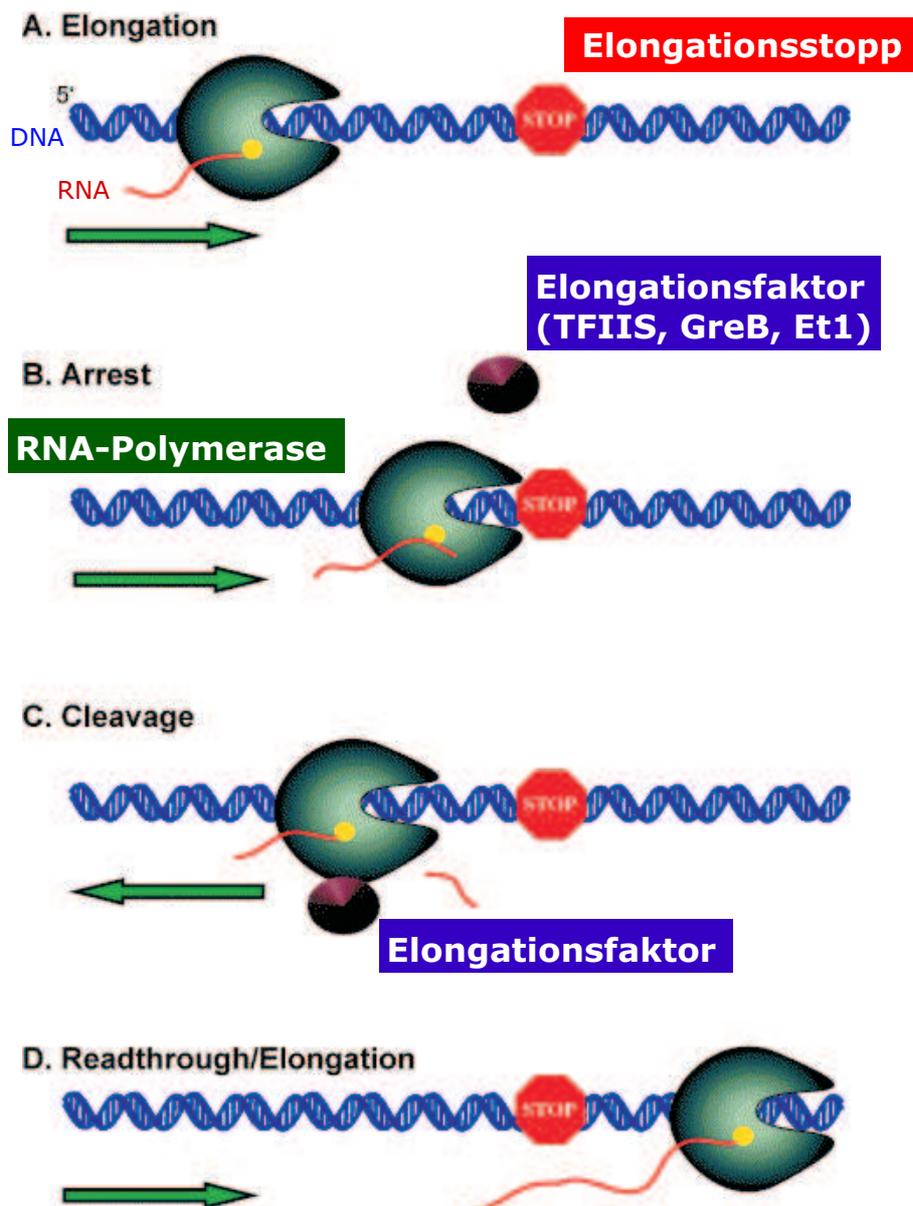


Abb. 35 : Modell zur Interaktion von Elongationsfaktoren wie TFIIS, GreB und ETCHED1 mit der RNAP. Ein RNAP-Elongationskomplex (A) kann aus unterschiedlichen Gründen während der Transkription arretiert werden (symbolisch durch ein STOP-Schild angedeutet). Die Elongation kann nicht fortgesetzt werden (B). Der RNAP-Komplex bewegt sich stromaufwärts (backtracking) und verliert Kontakt zum 3'-Ende des naszierenden Transkripts. Nach Interaktion mit einem spezifischen Elongationsfaktor kann dieses wenige Nukleotide lange RNA-Fragment durch die endonukleolytische Aktivität der RNAP abgespalten werden (C) und das neu generierte 3'-Ende kann als Substrat für die weitere Transkriptelongation fungieren (D). DNA ist in blau, RNA in rot, das zentrale Metallion der RNAP in gelb dargestellt, *verändert nach* FISH und KANE (2002).

bracht und die Transkriptionsaktivität im weiteren Verlauf bestimmt (3.3.7). Wird das Nukleotid 3'-Desoxy-ATP (Cordycepin) während der Elongation in die RNA eingebaut, wird die Kettenverlängerung unterbrochen, da nun am 3'-Ende des naszierenden Transkriptes keine Hydroxylgruppe für die Kondensation eines weiteren Nukleotids zur Verfügung steht. Die Transkription kommt unter diesen Umständen zwangsläufig zum Erliegen und kann wahrscheinlich nur nach einer hydrolytischen Abspaltung eines RNA-Fragmentes am 3'-Ende wieder aufgenommen werden. Es konnte gezeigt werden, daß auch die TAC-RNAP über die von anderen RNAPs bekannte Nukleaseaktivität verfügt, denn trotz des Einbaus von Cordycepin in die RNA kann über einen längeren Zeitraum eine Zunahme von Transkripten beobachtet werden (Abb. 26). Dies ist nur möglich, wenn die arretierten Elongationskomplexe wieder reaktiviert werden und erneut die Transkription aufnehmen können. Vergleicht man die Transkriptionsaktivität in einer TAC-Fraktion des Wildtyps mit der der ET1-defizienten Linie *et1-R*, so zeigte sich im Fall des Wildtyps eine deutlich erhöhte Transkriptionsrate. Vor allem in den ersten Minuten nach der Zugabe von Cordycepin, wenn die Transkriptmenge bei der Mutante sogar noch unter den Ausgangswert fällt, ist die Transkription im Fall des Wildtyps vergleichsweise stark erhöht. Im weiteren Verlauf nahm die Transkriptmenge in der Mutante wieder leicht zu, das Niveau des Wildtyps wurde jedoch nicht erreicht. Dies zeigt, daß diese Nukleaseaktivität der TAC-RNAP offenbar zusätzlich von ET1 stimuliert wird. Senkt man die Temperatur, bei der die Transkription durchgeführt wird ab, ist zwischen den beiden TAC-Extrakten dieser starke Unterschied nicht mehr messbar (Abb. 26B). Die Transkriptionsrate von TAC-Extrakten der *et1-R*-Mutante liegt aber weiterhin unter der des Wildtyps. Durch die reduzierte Aktivität der Enzyme infolge der niedrigeren Temperatur ist die ET1-induzierte Endonukleaseaktivität der TAC-RNAP offenbar kein geschwindigkeitslimitierender Faktor mehr bei der Transkriptelongation. Möglicherweise besitzen RNA-Polymerisation und 'cleavage'-Reaktion unterschiedliche Temperaturoptima und reagieren somit auch unterschiedlich sensitiv auf niedrige Temperaturen. Es ist denkbar, daß bei 15°C die schwache intrinsische Nukleaseaktivität der TAC-RNAP für die Reaktivierung eines durch Einbau von Cordycepin arretierten Elongationskomplexes ausreicht. Vergleichbar ist dies mit Mutanten von *E. coli*, denen die zu TFIIS und ET1 funktionshomologen Faktoren GreA und GreB fehlen, die bei hohen Temperaturen nicht wachsen können. Sie weisen aber dennoch

eine intrinsische 'cleavage'-Aktivität ihrer RNAP auf (ORLOVA *et al.*, 1995).

Nachdem festgestellt werden konnte, daß die TAC-RNAP über eine endonukleolytische Aktivität verfügt, wurde die Länge der durch die 'cleavage'-Reaktion erhaltenen RNA-Stücke bestimmt. Unabhängig von der Zugabe von Cordycepin wurden Fragmente von 8-13 Nukleotiden erhalten, sowohl im Fall des Wildtyps als auch der et1-R-Linie (Abb. 27). Die Länge der erhaltenen Oligonukleotide entspricht damit denen von 'cleavage'-Produkten anderer RNAPs. Arretierte RNAP II-Elongationskomplexe spalten in Abhängigkeit von der Induktion durch TFIIS unterschiedlich lange RNA-Fragmente ab. Bei Komplexen ohne TFIIS wurde meist die Abspaltung von Dinukleotiden beobachtet, seltener wurden längere Fragmente von 3-9 Nukleotiden gemessen (IZBAN und LUSE, 1993; GU und REINES, 1995). Wird die 'cleavage'-Reaktion allerdings durch den Faktor TFIIS induziert, so werden Oligonukleotide mit einer Länge von 7-17 Nukleotiden (IZBAN und LUSE, 1993; RUDD *et al.*, 1994) abgespalten. Während der bakterielle Faktor GreA eine Abspaltung von 2-3 Nukleotiden induziert, werden durch die von GreB abhängige Endonukleaseaktivität der bakteriellen RNAP RNA-Fragmente von bis zu 18 Nukleotiden freigesetzt (BORUKHOV *et al.*, 1993; TOULMÉ *et al.*, 2000). Während die RNAP II und die RNAP von *E. coli* eine endonukleolytische Aktivität zeigen, scheint die T7-Phagen-RNAP eine 3'→5'-Exonukleaseaktivität zu besitzen, die vermutlich Mono- und Dinukleotide freisetzt (SASTRY und ROSS, 1997). Eine genaue Bestimmung der Länge von 'cleavage'-Produkten, die von Phagenpolymerasen stammen, wurde bislang noch nicht durchgeführt. Von welcher RNAP die detektierten 'cleavage'-Produkte in der TAC-Fraktion stammen, kann anhand dieser Daten nicht festgestellt werden.

Um den Mechanismus der Endonukleaseaktivität der plastidären TAC-RNAP zu verstehen, kann auf Daten zurückgegriffen werden, die von anderen RNAPs bekannt sind. Die meisten RNAPs haben einen ähnlichen Aufbau, sowohl im Hinblick auf ihre Kristallstruktur als auch auf ihren enzymatischen Mechanismus (CRAMER, 2002; EBRIGHT, 2000). Durch Röntgenstrukturanalyse wurde die dreidimensionale atomare Struktur der kompletten RNAP II rekonstruiert (Abb. 36). Diese besteht aus einem katalytischen Kern mit 10 Polypeptiden, die zusammen ein Molekulargewicht von insgesamt etwa 500 kD haben,

und einem zusätzlichen Heterodimer, das neben weiteren Faktoren für die Transkriptinitiation verantwortlich ist (ARMACHE *et al.*, 2003; CRAMER *et al.*, 2001; GNATT *et al.*, 2001).

Zwischen zwei großen Proteinuntereinheiten des zentralen Teils der RNAP II klafft eine tiefe Spalte, die die DNA aufnimmt. Das aktive Zentrum des Enzyms befindet sich am Boden dieser Spalte, wo sich noch ein Magnesiumionen-Paar befindet, welches beim Umschalten zwischen Synthese und Degradation der RNA eine entscheidende Rolle spielt (SOSUNOVA *et al.*, 2003). Öffnen und Schließen der Spalte zur Bindung von DNA im Zentrum der RNAP wird durch eine be-

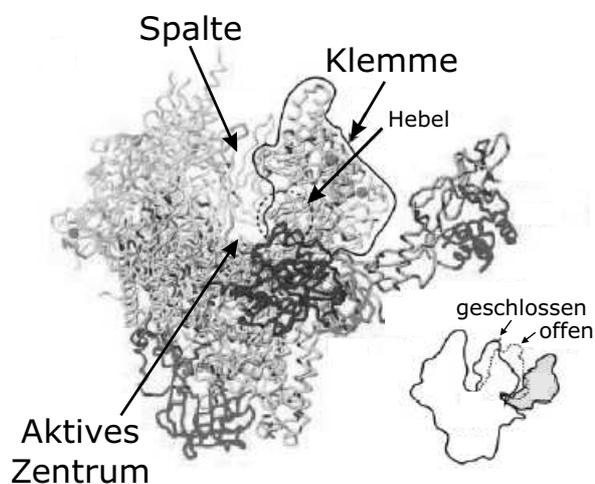


Abb. 36 : Struktur der RNAP II.  
(verändert nach ARMACHE *et al.* (2003)).

wegliche Domäne herbeigeführt, die sich wie eine molekulare Klemme über der DNA-Matrize und dem mRNA-Produkt schließt (ARMACHE *et al.*, 2003). Eine ähnliche Struktur hat auch die bakterielle RNAP, obwohl sie aus weit weniger Untereinheiten besteht (CRAMER, 2002; EBRIGHT, 2000; ZHANG *et al.*, 1999). Der Mechanismus, mit dem der Faktor TFIIS arretierte RNAP II-Elongationskomplexe durch Induktion einer 'cleavage'-Reaktion reaktivieren kann, wurde kürzlich aufgeklärt. KETTENBERGER *et al.* (2003) konnten den RNAP II-Komplex mit dem gebundenen Faktor TFIIS kristallisieren. Dabei konnte festgestellt werden, daß eine im freien TFIIS ungefaltete Domäne (OLMSTED *et al.*, 1998) nach Bindung an die RNAP II eine  $\alpha$ -Helix ausbildet, die ebenfalls in ET1 vorhanden ist. Durch die Ausbildung der  $\alpha$ -Helix kann das Protein mit der RNAP II interagieren. Dabei reicht es mit seiner bereits erwähnten 'hairpin'-Struktur mit den zwei sauren Aminosäureresten (3.3) bis in das katalytische Zentrum der RNAP hinein und kann eine Konformationsänderung verursachen. Möglicherweise wird hier über die Bindung eines der beiden Metallionen im Zentrum der RNAP ein Umschalten von Synthese hin zur 'cleavage'-Reaktion induziert, ähnlich wie dies im aktiven Zentrum der Klenow-Exonuklease der Fall ist (BEESE und STEITZ, 1991; JOYCE und STEITZ, 1994). Für die RNAP von *E. coli* konnte die Beteiligung beider Magnesiumionen bei der 'cleavage'-Aktivität bereits gezeigt werden (SOSUNOVA *et al.*, 2003). Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit von ET1 zu TFIIS ist

der von diesem Faktor induzierte Mechanismus ebenfalls für die TAC-RNAP anzunehmen. TFIIS wird ubiquitär in Eukaryoten exprimiert, der Faktor GreB übernimmt eine ähnliche Aufgabe in Eubakterien.

GreB und der sequenzhomologe Faktor GreA (BORUKHOV *et al.*, 1993) fungieren als transiente katalytische Komponenten der bakteriellen RNAP (LAPTENKO *et al.*, 2003) und sind allen Eubakterien gemein (KOULICH *et al.*, 1997). Es ist bekannt, daß diese Faktoren eine 'cleavage'-Reaktion induzieren und arretierte RNAP-Elongationskomplexe reaktivieren können. Dabei stimulieren GreA und GreB die 'cleavage'-Reaktion auf unterschiedliche Weise: GreA verhindert offenbar die Entstehung von arretierten Komplexen, während GreB bereits arretierte Komplexe reaktivieren kann (BORUKHOV *et al.*, 1993). Ähnlich wie bei TFIIS gaben Röntgenstrukturanalysen Aufschluß über die Funktionsweise von GreB (OPALKA *et al.*, 2003). Die Sequenzen von TFIIS und GreB unterscheiden sich in einigen Bereichen zwar grundlegend (MORIN *et al.*, 1993; OLMSTED *et al.*, 1998), denn GreB verfügt anstelle einer  $\beta$ -Faltblattstruktur über eine sogenannte 'coiled-coil' Struktur. Die funktionelle Ähnlichkeit der Domänen ist jedoch herausragend (Abb. 37). Die Faktoren haben sich offenbar unabhängig voneinander entwickelt, nutzen aber den gleichen molekularen Mechanismus. So interagiert die Spitze der 'coiled-coil' Struktur mit hochkonservierten Domänen der RNAP-Untereinheiten  $\beta$  und  $\beta'$ . Im aktiven Zentrum der bakteriellen RNAP befinden sich wie bei der RNAP II zwei chelatierte Magnesiumionen. An der Spitze der 'coiled-coil' Domäne von GreB befinden sich zwei konservierte saure Aminosäurereste, die essentiell für dessen Funktion sind und auch in TFIIS vorliegen. In ET1 liegt allerdings nur einer dieser beiden sauren Aminosäurereste vor. Die Interaktion von GreB mit der RNAP induziert eine 'cleavage'-Reaktion und reaktiviert die RNAP.

Auch das Transkriptionssystem von Archaeobakterien, das eine vereinfachte Form des eukaryotischen RNAP II-Systems darstellt (BELL und JACKSON, 2001; SOPPA, 2001; THOMM, 1996), verfügt über einen ähnlichen Mechanismus wie die bakteriellen und eukaryotischen RNAPs. Der mit TFIIS verwandte Transkriptionsfaktor TFS der Archaeobakterien kann ebenfalls eine 'cleavage'-Reaktion induzieren und so arretierte RNAP-Komplexe reaktivieren (HAUSNER *et al.*, 2000; LANGE und HAUSNER, 2004).

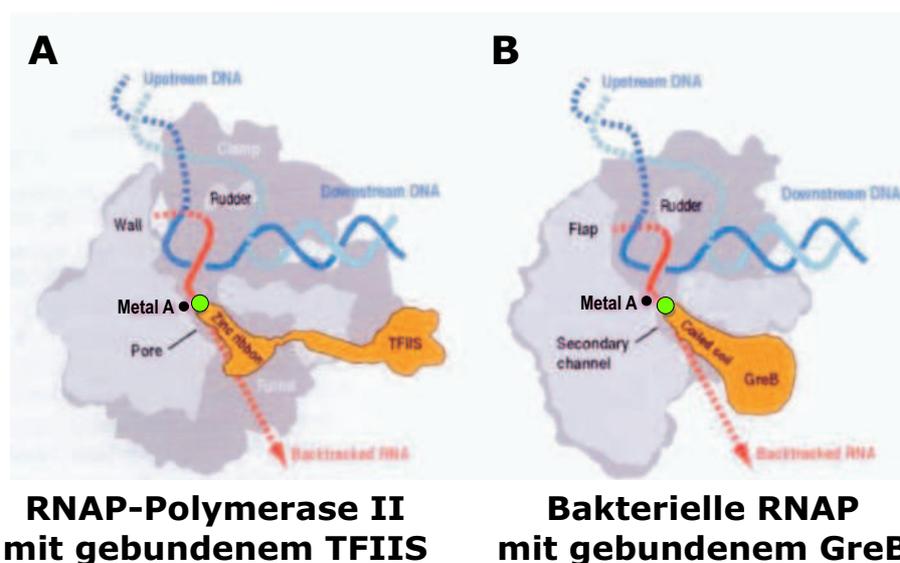


Abb. 37 : Struktur des Komplexes der arretierten RNA-Polymerase II mit TFIIS (A) und der arretierten eubakteriellen RNAP mit GreB (B). Die wichtigsten Domänen der RNA-Polymerasen sind bezeichnet. Die Position der konservierten sauren Aminosäuren sind in grün, das naszierende Transkript in rot und die DNA-Matrize in blau dargestellt, verändert nach CONAWAY *et al.* (2003).

Für die RNAP von Bakteriophagen ist die Situation vermutlich ähnlich. Im Genom des Phagen PM2, dem einzigen Vertreter der *Corticoviridae*, welcher einige Pseudoalteromonaden infizieren kann, befindet sich unter den insgesamt 21 kodierten Proteinen (MÄNNISTÖ *et al.*, 1999) eines mit einem Zinkfinger-Motiv, das Ähnlichkeit zu der ZR-Domäne von TFIIS aufweist (MÄNNISTÖ *et al.*, 2003). Der Phage verfügt über keine eigene RNAP und bedient sich zur Transkription seiner Gene der seines Wirtes. Daher wird angenommen, daß dieses Protein auch in Verbindung mit der bakteriellen RNAP eine ähnliche Funktion wie TFIIS ausübt.

Andere Phagen besitzen eine eigene RNAP. Bei der Infizierung von *E. coli* durch den Phagen T7 wird die RNAP der Wirtszelle durch Phosphorylierung der RNAP-Untereinheit  $\beta'$  inaktiviert und das Genom der Wirtszelle abgebaut. Die phageneigene RNAP übernimmt die Transkription von Genen (DUNN und STUDIER, 1983; MOLINEUX, 2001). Faktoren mit ähnlicher Funktion wie TFIIS oder GreB sind hier noch nicht bekannt. Die nur aus einer Untereinheit bestehende Phagenpolymerase scheint keine weiteren Faktoren für ihre Funktionsfähigkeit zu benötigen, sowohl was die Polymerisationsreaktion als auch die hydrolytische Aktivität betrifft. Es ist möglich, daß bei dieser RNAP, wie im Fall des *Vac-*

*cinia* Virus eine intrinsische Nukleaseaktivität ausreicht. Wie in der vorliegenden Arbeit wurde dort die endonukleolytische Aktivität der RNAP über den Einbau eines modifizierten Nukleotids (3'OMeGTP) nachgewiesen. Interessanterweise besitzt die Sequenz einer RNAP-Untereinheit des Virus Homologie zur Sequenz von TFIIS. Es wird angenommen, daß diese Untereinheit (rpo30) bei der Induktion der 'cleavage'-Reaktion eine Rolle spielt und die dann ohne weitere Faktoren abläuft (HAGLER und SHUMAN, 1993). Auch die hydrolytische Aktivität der RNAP III im Zellkern von Eukaryoten scheint unabhängig von weiteren Faktoren zu sein (WHITEHALL *et al.*, 1994).

In der Tat haben alle RNAPs eine intrinsische Nukleaseaktivität, die in einigen Fällen durch zusätzliche Faktoren stark erhöht werden kann.

'Cleavage'-Reaktionen und deren faktorabhängige Induktion sind also für verschiedenste Organismen und RNAPs gezeigt worden und sind aufgrund der vorliegenden Ergebnisse auch in Plastiden zu erwarten. Das ET1-Protein und die in anderen Pflanzenarten homologen ZR1-Proteine sind vermutlich solche Faktoren.

Fraglich ist noch, mit welcher RNAP ET1 interagiert. Unabhängig davon, ob die NEP-Aktivität einer phagenähnlichen RNAP zuzuschreiben ist, lassen Daten von Röntgenstrukturanalysen der zur PEP ähnlichen RNAP aus *E. coli* und der RNAP von T7-Phagen aufgrund ihrer Struktur beide Varianten zu. Trotz der unterschiedlichen Größe der verschiedenen RNAPs, sind sie in ihrer Grundstruktur recht ähnlich (BORUKHOV und NUDLER, 2003; SEVERINOV, 2001; TAHIROV *et al.*, 2002). Eine Endonukleaseaktivität ist auch für die T7-Phagen RNAP beschrieben (SASTRY und ROSS, 1997). Ob diese durch zusätzliche Faktoren noch stimuliert werden kann, ist aber nicht bekannt. Wie sich die Situation allerdings im TAC *in vivo* darstellt, kann derzeit nicht beantwortet werden. Dementsprechend ist auch die Frage nach dem Interaktionspartner von ET1 noch aufzuklären.

Nimmt man die entwicklungsabhängige Expression von *Hvzr1* und *Hvzr2* als Anhaltspunkt, kann man in Übereinstimmung mit der Annahme, daß die Transkription in Proplastiden einer NEP-Aktivität und in differenzierten Chloroplasten weitgehend einer PEP-Aktivität zuzuordnen ist (MALIGA, 1998), spekulieren, daß ET1 bzw. ZR1-Proteine mit einer NEP, ZR2-Proteine hingegen mit der PEP zusammenarbeiten. ZR1-Proteine scheinen in einer frühen Entwicklungsphase benötigt zu werden. Fehlt ZR1, reicht die von zusätzlichen Fakto-

ren unabhängige Nukleaseaktivität plastidärer RNAPs offenbar nicht aus, damit die Pflanzen sich entwickeln können. Eine Ausnahme bildet der Mais. Hier liegt durch eine Gen-duplikation neben *et1* noch das *Zmzr1*-Gen vor. Das kodierte Protein ZmZR1 kann wahrscheinlich das Fehlen von ET1 teilweise kompensieren und es resultieren Pflanzen mit dem beschriebenen Phänotyp. In einer späteren Entwicklungsphase übernimmt möglicherweise zusätzlich ZmZR2 die Funktion der Induktion der 'cleavage'-Reaktion plastidärer RNAPs, so daß ET1-defiziente Mutanten dann keinen Phänotyp mehr aufweisen. Ob die gemessene Transkriptakkumulation in der ET1-defizienten Maislinie nach künstlichem Stoppen der RNA-Synthese durch Cordycepin (Abb. 26) auf eine von einem anderen Faktor abhängige Endonukleaseaktivität zurückzuführen ist, muß noch untersucht werden.

### 4.3 Zusammensetzung und Transkriptionsaktivität von sRNAP-Extrakten aus Maischloroplasten

Lösliche transkriptionsaktive Extrakte aus Chloroplasten von Mais wurden anhand des von LIERE und MALIGA (1999) beschriebenen Protokolls erhalten. In dieser Fraktion ist hier eine Vielzahl von Proteinen vorhanden (Abb. 29). Immunologische Untersuchungen zeigten klar, daß wie in TAC-Extrakten die  $\alpha$ -Untereinheit der PEP in der sRNAP-Fraktion vorliegt (Abb. 30). In löslichen Fraktionen, die im Zuge der TAC-Aufreinigung gewonnen wurden (KRAUSE, 1999) oder über Heparinsäulen und eine wie auch in dieser Arbeit verwendete Ammoniumsulfatfällung (PFANNSCHMIDT *et al.*, 2000), wurden ebenfalls Untereinheiten der PEP gefunden. Eine NEP vom Phagentyp konnte allerdings unter Verwendung verschiedener Antikörper weder im TAC (Abb. 14) noch in der sRNAP-Fraktion immunologisch nachgewiesen werden. Ob dies an der Sensitivität der Antikörper, der geringen Abundanz dieser Enzyme oder daran liegt, daß die Transkriptionsaktivität in der sRNAP-Fraktion auf eine andere RNAP-Aktivität zurückzuführen ist (BLIGNY *et al.*, 2000), ist unklar.

Das über Photoaffinitätsmarkierung erhaltene Proteinmuster gibt keinen konkreten Hinweis auf vorhandene RNAPs (Abb. 34). Auch wenn ein Protein von 110 kD markiert wurde, muß es sich dabei nicht um eine NEP vom Phagentyp handeln. Zudem ähnelt das erhaltene Proteinmuster dem von TAC-Extrakten (KRAUSE, 1999) und auch in diesem Extrakt wurden Untereinheiten der TAC-RNAP markiert.

Das ET1-Protein, das in TAC-Extrakten gefunden wurde, befindet sich offenbar nicht in der sRNAP-Fraktion (Abb. 30). Selbst bei Einsatz großer Proteinmengen kann das Protein immunologisch nicht nachgewiesen werden. Bei der Analyse der Länge von 'cleavage'-Produkten, wie sie durch die faktorinduzierte Endonukleaseaktivität der TAC-RNAP entstehen, sind in sRNAP-Extrakten keine Oligonukleotide von über fünf Nukleotiden detektiert worden (Abb. 27). Dieser Befund war durch das Fehlen von ET1 zu erwarten. Möglicherweise gibt es aber kleinere 'cleavage'-Produkte, die mit der hier verwendeten Methode nicht erfaßt worden sind. Sollte es sich bei möglichen RNA-Fragmenten um Mono- oder Dinukleotide handeln, würde dies für eine exonukleolytische Aktivität einer phagenähnlichen RNAP sprechen, für die derart kleine Abspaltungsprodukte vermutet werden (SASTRY und ROSS, 1997).

Die Transkriptionsaktivität der isolierten sRNAP weist eine starke Präferenz gegenüber plastidärer DNA auf (Abb. 31). Die Transkriptionsrate ist bei Verwendung von ptDNA gegenüber Kalbsthymus-DNA um das Vierfache erhöht. Bei vorangegangenen Untersuchungen plastidärer sRNAP-Extrakte wurde die Transkriptionsaktivität ausschließlich mit Kern-DNA aus Pflanzen (BOTTOMLY *et al.*, 1971), Kalbsthymus-DNA (KRAUSE, 1999; PFANNSCHMIDT und LINK, 1994; SUCK, 1996) oder Plasmiden bestimmt (LIERE und MALIGA, 1999; SUZUKI *et al.*, 2004). Durch die hier erhaltene Transkriptionsaktivität mit ptDNA als 'Template' war es möglich, die Genspezifität der RNAPs der löslichen Extrakte näher zu analysieren. Dazu wurden die *in vitro* synthetisierten Transkripte mit DNA-'Dot-blot'-Membranen hybridisiert, auf denen verschiedene plastidäre genspezifische DNA-Fragmente immobilisiert worden waren. Dabei wurden Gene ausgewählt, die über verschiedene Promotoren verfügen. Allerdings besitzt die isolierte sRNAP-Fraktion unabhängig von exogener DNA eine geringe Transkriptionsaktivität. Diese ist aufgrund des identischen Hybridisierungsmusters im Vergleich zu *in vitro*-Transkripten aus TAC-Extrakten (Abb. 25) eindeutig einer TAC-Aktivität zuzuordnen (Abb. 32). Abgesehen von diesem Befund ist das Ergebnis der Hybridisierung mit Transkripten, die unter Zugabe von ptDNA erhalten wurden, äußerst überraschend. Es wurde erstmals ein vollkommen anderes Transkriptionsmuster erhalten als in allen vorangegangenen Experimenten zur Untersuchung

plastidärer Transkripte von TAC-Extrakten (FALK *et al.*, 1993; KRAUSE und KRUPINSKA, 2000), 'run-on'-Transkriptionsanalysen mit intakten Chloroplasten (KRAUSE, 1999; KRAUSE *et al.*, 2000) oder 'steady-state'-Analysen plastidärer RNA (LEGEN *et al.*, 2002). Der deutlichste Unterschied liegt in einer stark erhöhten Transkription der Untereinheiten der PEP. So wird das *rpoB/C1/C2*-Operon, das ausschließlich über einen NEP-Promotor verfügt (SILHAVY und MALIGA, 1998), verstärkt transkribiert. Allein dieser Umstand legt die Vermutung nahe, daß die Transkriptionsaktivität der sRNAP-Fraktion von nukleär kodierten RNAPs hervorgerufen wird.

Ein weiterer interessanter Aspekt des Hybridisierungsmusters im *rpo*-Operon ist, daß die einzelnen Gene, obwohl sie in einer Transkriptionseinheit liegen, offenbar unterschiedlich exprimiert werden. So wird *rpoB* stärker transkribiert als die dahinterliegenden Gene *rpoC1* und *rpoC2*.

Neben den *rpo*-Genen werden noch weitere Gene verstärkt transkribiert. Dazu zählen auch Gene, die für Proteine des Photosyntheseapparates kodieren und deren RNA vornehmlich durch die PEP synthetisiert wird. Die Expression von *psbA*, *psbC*, *psbD* und *psbE* ist jedoch licht- und entwicklungsabhängig reguliert (SATO *et al.*, 1999). Die verstärkte Transkription von *psbC/D* muß nicht unbedingt einer PEP-Aktivität zuzuschreiben sein, denn auf diesem Operon wurden allein vier unterschiedliche Promotoren gefunden (WADA *et al.*, 1994). Außerdem kann selbst in transgenen Tabakpflanzen, denen die  $\beta$ -Untereinheit der PEP fehlt, eine geringe Transkription dieses Operons gemessen werden (ALLISON *et al.*, 1996). *psbA* wird von einem  $\sigma^{70}$ -Typ von der PEP transkribiert (BOYER und MULLETT, 1998). Geringe Mengen des Transkripts können aber selbst in der weißen, ribosomendefizienten Gerste 'Albostrians' nachgewiesen werden (EMANUEL *et al.*, 2004). Außerdem unterliegt *psbA* einer starken posttranskriptionellen Kontrolle (EIBL *et al.*, 1999; KATZ und DANON, 2002).

Die übrigen Unterschiede im Transkriptionsmuster sind einer NEP-Aktivität zuzuschreiben. Die Regulation ribosomaler Gene (*rpl*, *rps*) kann keinem Promotor exklusiv zugeordnet werden (HESS und BÖRNER, 1999), eine verstärkte Transkription durch eine NEP ist durchaus denkbar. Die stärkeren Signale, die für *atpA* erhalten wurden, sprechen klar für eine NEP-abhängige Transkription. Das *atpI/atpA/rps2*-Operon besitzt einen NEP-Promotor (MIYAGI *et al.*, 1998) und wird auch in *rpoB*-defizienten transgenen Tabakpflanzen genauso

stark wie im Wildtyp exprimiert (ALLISON *et al.*, 1996). Ebenso besitzt das *petA*-Gen einen NEP-Promotor, dessen Transkription durch die sRNAP in Anwesenheit von ptDNA ebenfalls hochreguliert wird. Somit scheint in diesen Extrakten verstärkt eine NEP-Aktivität vorhanden zu sein.

Unterstützt wird dieses Ergebnis durch Transkriptionsanalysen in Gegenwart von Hemmstoffen. Die Transkription der sRNAP wird durch den für die PEP und die prokaryotische RNAP spezifischen Hemmstoff Rifampicin nicht oder nur in geringem Ausmaß gehemmt (Abb. 33; LIERE und MALIGA (1999); KRAUSE und KRUPINSKA (2000)). Dieser Befund zeigt, daß die Transkriptakkumulation durch die sRNAP-Aktivität auf einer Neuinitiation der RNA-Synthese beruht. Rifampicin hemmt die *E. coli*-RNAP und damit auch die PEP bereits bei der Initiation (CAMPBELL *et al.*, 2001), eine PEP-spezifische Transkription ist daher nicht anzunehmen. Des weiteren nicht klar, ob die für eine Initiation durch die PEP notwendigen SLFs im Extrakt vorliegen.

Verunreinigungen durch RNAPs aus dem Zellkern sind durch die Unempfindlichkeit gegenüber  $\alpha$ -Amanitin nicht wahrscheinlich. Auch die Effekte der übrigen eingesetzten Hemmstoffe unterscheiden sich, abgesehen von der Sensitivität gegenüber Tagetitoxin, nicht von bekannten Daten (LIERE und MALIGA, 1999; KRAUSE und KRUPINSKA, 2000). Tagetitoxin hemmt sowohl die RNAP von *E. coli* als auch die der RNAP II (MATHEWS und DURBIN, 1990). Ebenso wird die Transkription der menschlichen RNAP III in Konzentrationen von unter 10  $\mu$ M stark reduziert, während die pflanzliche und die des Seidenspinners *Bombyx mori* eine mindestens zehnmal geringere Sensitivität gegenüber Tagetitoxin haben (STEINBERG *et al.*, 1990). Eine Verunreinigung der hier bearbeiteten sRNAP mit der RNAP III aus dem Zellkernen ist daher unwahrscheinlich, zumal die RNAP III nur für die Transkription von tRNA verantwortlich ist.

Da auch die Transkription von Phagenpolymerasen in gewissem Umfang gehemmt wird (Abb. 9), sollte Tagetitoxin nicht als ein 'Marker' für eine NEP-Aktivität in Plastiden herangezogen werden. Es ist durchaus auch möglich, daß die gemessene Transkriptionsaktivität nicht von einer phagenähnlichen RNAP ausgeht. Dies greift die Diskussion wieder auf, wie viele NEPs in Plastiden tatsächlich aktiv sind und legt die Vermutung nahe, daß die Transkriptionsmaschinerie in Plastiden komplexer ist, als bislang angenommen wird. Auch wenn vermutet wird, daß die Transkriptionsaktivität der NEP von phagenähnlichen

RNAPs ausgeht, fehlt weiterhin der direkte Beweis, daß die NEP mit den Genprodukten von *rpoT*-Genen identisch ist (HESS und BÖRNER, 1999; LIERE und MALIGA, 2001). Es konnte bislang lediglich festgestellt werden, daß die Transkriptakkumulation von Genen mit NEP-Promotoren mit der von *rpoT*-Genen in Gerste korreliert (EMANUEL *et al.*, 2004) und die Überexpression des von *rpoTp*-Gens in Tabak in einer verstärkten Transkription von NEP-Promotoren resultiert (LIERE *et al.*, 2004; MAGEE und KAVANAGH, 2002). Promotoren, denen die typische YRTA-Konsensussequenz fehlt, sind davon jedoch nicht betroffen. Des Weiteren werden einige plastidäre tRNA-Gene von internen Promotoren transkribiert (GRUISSEM *et al.*, 1986a) und es wurden zusätzliche nukleär kodierte Transkriptionsaktivitäten für das *rrn*-Operon aus Spinat (BLIGNY *et al.*, 2000) und *A. thaliana* (SRIRAMAN *et al.*, 1998) gefunden. Es stellt sich auch die Frage, warum dikotyle Pflanzen zwei Gene für plastidäre phagenähnliche RNAPs besitzen, monokotyle hingegen nur eine. *In vivo* wird die Genregulation in Plastiden ohnehin nicht nur von der Transkription beeinflusst. Unabhängig davon, von welcher RNAP Transkriptionsaktivität ausgeht, findet auch eine posttranskriptionelle Kontrolle statt, in die viele weitere Faktoren involviert sind. Auch über die Stabilität der mRNA findet eine Regulation der Proteinbiosynthese und somit auch der Transkriptionsprodukte von PEP und NEPs statt (CAHOON *et al.*, 2004).

#### 4.4 Ausblick

Durch die in dieser Arbeit etablierte verbesserte Extraktionsmethode für TAC-Proteine besteht nun die Möglichkeit, weitere Proteine aus TAC-Extrakten nachzuweisen und anschließend zu charakterisieren. Diese weiteren Komponenten des TAC können über eine zweidimensionale Auftrennung und massenspektrometrische Analyse der Peptide der Proteine identifiziert werden. Dabei ist immer noch von besonderem Interesse zu klären, welche Art von nukleär kodierten RNAPs in TAC-Extrakten vorliegen. Daneben steht auch die Identifizierung von Transkriptionsfaktoren und vor allem möglichen weiteren Elongationsfaktoren im Vordergrund.

Zur näheren Klärung der Funktion des ET1-Proteins sollten weitere Experimente durchgeführt werden. Bei der Untersuchung der Induktion der Endonukleaseaktivität durch ET1 sollte die Länge der RNA-Abspaltungsprodukte in Abhängigkeit der Temperatur bestimmt

werden. Dabei sollte auch eine Methode zur Detektion von Mono- und Dinukleotiden etabliert werden. Es stellt sich auch die Frage, ob ET1 der einzige Elongationsfaktor im Zusammenhang mit der TAC-RNAP ist. Die unterschiedliche entwicklungsabhängige Expression von *zr*-Genen läßt vermuten, daß mehrere Elongationsfaktoren in verschiedenen Plastidentypen aktiv sein könnten. Daher sollte untersucht werden, mit welcher RNAP ET1 interagiert und in welchen Entwicklungsstadien ET1 bzw. die gesamte Familie plastidärer ZR-Proteine benötigt werden. Dazu könnten Interaktionsstudien durchgeführt werden oder TAC-Fraktionen aus verschiedenen Plastidentypen isoliert werden, wobei sich Gräser und insbesondere Gerste zur Untersuchung dieser Fragestellung anbieten. Bereits vorhandene transgene Maispflanzen, in denen ZmZR1 und GFP in Fusion vorliegen, können zu einer weiteren Aufreinigung von TAC-Fraktionen eingesetzt werden. Durch eine Immunitätschromatographie könnten hochreine TAC-Fraktionen isoliert werden.

Lösliche transkriptionsaktive Extrakte enthalten wie vermutlich auch die TAC-Fraktion neben der PEP wahrscheinlich auch nukleär kodierte RNAPs. Es konnte bislang noch nicht geklärt werden, ob diese NEP-Aktivität auf eine phagenähnliche RNAP zurückzuführen ist oder auf weitere bislang noch nicht charakterisierte RNAP. Es ist ebenfalls zu klären, ob SLFs in dieser RNAP-Fraktion vorhanden sind und damit auch die PEP aktiv sein kann. Nachdem gezeigt worden ist, dass sRNAP-Extrakte ptDNA transkribieren, können die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche zur Analyse der Genspezifität der RNAPs anhand von Hybridisierungen von Transkripten mit allen plastidären Genen erweitert werden. Interessant ist hierbei auch, inwieweit die Transkription einzelner Gene innerhalb von Operons reguliert wird, denn wie bereits am Beispiel des *rpoB/C1/C2*-Operons gezeigt werden konnte, kann die Transkriptionsrate der einzelnen Gene eines Operons variieren.

## 5 Zusammenfassung

Zur Untersuchung des Transkriptionsapparates von Plastiden wurden sowohl eine membrangebundene Fraktion als auch eine lösliche Fraktion aus Chloroplasten analysiert. Dabei wurden 'Transkriptionsaktive Chromosomen' (TAC) aus Mais-, Gerste-, und Spinatchloroplasten und eine lösliche sRNAP-Fraktion aus Maischloroplasten isoliert.

Für die Identifizierung von Proteinen der TAC-Fraktion konnte eine verbesserte Extraktionsmethode etabliert werden. Durch eine zweidimensionale Auftrennung der aus TAC-Fraktionen extrahierten Proteine konnte festgestellt werden, daß sich mit 80-100 Proteinen weit mehr Proteine im TAC befinden als bislang angenommen. Aufgrund der verbesserten Aufreinigung sind die Voraussetzungen für eine Identifizierung von TAC-Proteinen über Massenspektrometrie ihrer Peptide geschaffen.

Durch immunologische Analysen konnten zwei neue Proteine in TAC-Fraktionen detektiert werden. Neben TCP34 ('tetratricopeptid-repeat-chloroplast-protein of 34 kD'), das aufgrund seiner Struktur bei der Genregulation und Transkriptstabilisierung involviert sein könnte, konnte das ETCHED1-Protein nachgewiesen werden. Die Mutation des zugehörigen Gens *etched1* ruft in Maispflanzen einen komplexen Phänotyp hervor, der sich durch eine abnormale Entwicklung des Endosperms in den Körnern sowie eine verzögerte Chloroplastenentwicklung in den Blättern auszeichnet.

Die Proteinsequenz von ETCHED1 weist Homologien zu der Sequenz des eukaryotischen Transkriptionsfaktors TFIIS auf. Durch den Vergleich von TAC-Fraktionen aus einer ETCHED1-defizienten Mutante aus Mais mit dem Wildtyp, konnte gezeigt werden, daß ETCHED1 als Elongationsfaktor einer RNAP in der TAC-Fraktion agiert, ähnlich wie TFIIS mit der RNAP II im Zellkern. ETCHED1 kann nach Stoppen der Transkription durch den Einbau eines modifizierten Nukleotids die schwache intrinsische Endonukleaseaktivität der TAC-RNAP verstärken und so arretierte Elongationskomplexe reaktivieren.

Mit einem löslichen Extrakt aus Maischloroplasten konnte gezeigt werden, daß die RNA-Polymerase in dieser Fraktion eine hohe Transkriptionsrate in Anwesenheit plastidärer DNA besitzt. Dadurch konnte eine Analyse der Genspezifität der RNAP in dieser Fraktion

---

durchgeführt werden. Im Vergleich zu TAC-Transkripten und Transkripten aus 'run-on'-Experimenten mit intakten Chloroplasten wurde ein grundlegend anderes Transkriptionsmuster erhalten, welches wahrscheinlich auf die Aktivität einer nukleär kodierten RNA-Polymerase in dieser Fraktion zurückzuführen ist. Die RNAP-Aktivität in dieser Fraktion wird durch Rifampicin nicht gehemmt, zeigt jedoch eine starke Hemmung in Gegenwart von Tagetitoxin.

## 6 Summary

In order to analyze the transcriptional apparatus of plastids membrane bound and soluble fractions from chloroplasts were isolated. Transcriptional active chromosomes (TAC) were obtained from chloroplasts from maize, spinach and barley, soluble sRNAP fractions were isolated from maize chloroplasts.

To identify proteins from TAC fractions a new extraction method for proteins was established. Two-dimensional gel electrophoresis revealed 80-100 proteins to be present in TAC fractions. The improved extraction method provides the opportunity for the identification of TAC proteins using mass spectrometry.

Immunological analysis showed the proteins TCP34 and ETCHEDED1 to be components of TAC fractions. TCP34 ('tetratricopeptid-repeat-chloroplast-protein of 34 kD') is likely to be involved in RNA stability and gene regulation while ETCHEDED1 acts as a transcription factor. The ETCHEDED1 protein is encoded by the gene *etched1*. Mutation of *etched1* in maize affects the development of kernels as well as of seedlings. The deduced amino acid sequence of ETCHEDED1 exhibits significant similarity to the zinc ribbon domain of the eukaryotic transcription factor TFIIS. Comparison of TAC fractions obtained from wild-type and *etched1*-deficient mutants from maize demonstrates ETCHEDED1 to play a role in transcription elongation of the TAC-RNAP similar to the role of TFIIS in RNAP II transcription. ETCHEDED1 is capable of reactivating arrested TAC-RNAP elongation complexes when elongation is stopped by incorporation of a modified nucleotide by inducing the intrinsic ribonuclease activity of the polymerase.

Soluble sRNAP fractions from maize show a high transcriptional activity when using plastid DNA as a template. Thereupon the gene specificity of RNA polymerases in this fraction could be analyzed. The transcription pattern of this fraction was totally different from known patterns obtained by TAC-RNAP transcription or run-on analysis of intact chloroplast. Therefore the presence of a nuclear encoded RNA polymerase is assumed. The transcriptional activity of this sRNAP fraction is unaffected by the transcription inhibitor rifampicin but highly sensitive to tagetitoxin.

## Literaturverzeichnis

- AHREND M. (1998). Molekulare Analyse der *etched1-Reference* Mutante von *Zea mays* L. Diplomarbeit, Fachbereich Biochemie/Molekularbiologie der Universität Hamburg.
- ALBAUM M. (1993). Vergleichende molekulargenetische Untersuchungen zur Struktur und Transkription mitochondrialer Genloci des Radieschen-Cytoplasma Tokumasu. Dissertation, Fachbereich Biologie der Universität Hamburg.
- ALLISON L. (2000). The role of sigma factors in plastid transcription. *Biochimie*, 82: 537–548.
- ALLISON L., SIMON L. und MALIGA P. (1996). Deletion of *rpoB* reveals a second distinct transcription system in plastids of higher plants. *EMBO J.*, 15: 2802–2809.
- ARAVIND L. und KOONIN E. (2000). SAP - a putative DNA-binding motif involved in chromosomal organization. *Trends Biochem. Sci.*, 25: 112–114.
- ARMACHE K., KETTENBERGER H. und CRAMER P. (2003). Architecture of initiation-competent 12-subunit RNA polymerase II. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100: 6964–6968.
- ARNDT K. und CHAMBERLIN M. (1990). RNA chain elongation by *Escherichia coli* RNA polymerase. Factors affecting the stability of elongation ternary complexes. *J. Mol. Biol.*, 213: 79–108.
- BAGINSKY S., TILLER K. und 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.
- BAGINSKY S., TILLER K., PFANNSCHMIDT T. und LINK G. (1999). PTK, the chloroplast RNA polymerase-associated protein kinase from mustard (*Sinapis alba*), mediates redox control of plastid in vitro transcription. *Plant Mol. Biol.*, 39: 1013–1023.
- BEARDSLEE T., CHOWDHURY S., CHANG C., JAISWAL P., LERBS-MACHE S., STERN D. und ALLISON A. (2002). A nucleus-encoded maize protein with sigma factor activity accumulates in both chloroplasts and mitochondria. *Plant J.*, 31: 199–209.
- BEESE L. und STEITZ T. (1991). Structural basis for the 3'-5' exonuclease activity of *Escherichia coli* DNA polymerase I: a two metal ion mechanism. *EMBO J.*, 10: 25–33.
- BELL S. und JACKSON S. (2001). Mechanisms and regulation of transcription in archaea. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2: 208–213.
- BERENDS-SEXTON T., CHRISTOPHER D. und MULLET J. (1990). Light-induced switch in barley *psbD-psbC* promoter utilization: a novel mechanism regulating chloroplast gene expression. *EMBO J.*, 9: 4485–4494.

- BERGSLAND K. und HASELKORN R. (1991). Evolutionary relationships among eubacteria, cyanobacteria, and chloroplasts: evidence from the *rpoC1* gene of *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.*, 101: 3446–3455.
- BIRNBOIM H. und DOLY J. (1997). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.*, 7: 1513–1523.
- BLIGNY M., COURTOIS F., THAMINY S., CHANG C., LAGRANGE T., BARUAH-WOLFF J., STERN D. und LERBS-MACHE S. (2000). Regulation of plastid rDNA transcription by interaction of CDF2 with two different RNA polymerases. *EMBO J.*, 19: 1851–1860.
- BLUM H., BEIER H. und GROSS H. (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, 8: 93–99.
- BOOKJANS G., STUMMANN B. und HENINGSSEN K. (1984). Preparation of chloroplast DNA from pea plastids isolated in a medium of high ionic strength. *Anal. Biochem.*, 141: 244–247.
- BORUKHOV S. und NUDLER E. (2003). RNA polymerase holoenzyme: structure, function and biological implications. *Curr. Opin. Microbiol.*, 6: 93–100.
- BORUKHOV S., SAGITOV V. und GOLDFARB A. (1993). Transcript cleavage factors from *E. coli*. *Cell*, 72: 459–466.
- BOTTOMLY W., SMITH H. und BOGORAD L. (1971). RNA polymerases of maize: partial purification and properties of the chloroplast enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 68: 2412–2416.
- BOUDREAU E., NICKELSEN J., LEMAIRE S., OSSENBÜHL F. und ROCHAIX J. (2000). The *Nac2* gene of *Chlamydomonas* encodes a chloroplast TPR-like protein involved in *psbD* mRNA stability. *EMBO J.*, 19: 3366–3376.
- BOYER S. und MULLET L. (1998). Sequence and transcript map of barley chloroplast *psbA* gene. *Nucleic Acids Res.*, 16: 8184–8188.
- BRADFORD M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248–254.
- BRIAT J., LETOFFE S., MACHE R. und ROUVIERE-YANIV J. (1984). Similarity between the bacterial histon-like protein HU and a protein from spinach chloroplasts. *FEBS Lett.*, 172: 75–79.
- BRIAT J. und MACHE R. (1980). Properties and characterization of a spinach chloroplast RNA polymerase isolated from a transcriptionally active chromosome. *Eur. J. Biochem.*, 111: 503–509.

- BROWN R., JARVIS K. und HYLAND K. (1989). Protein measurement using bicinchonic acid: elimination of interfering substances. *Anal. Biochem.*, 180: 172–178.
- BYCROFT M., HUBBARD T., PROCTOR M., FREUND S. und MURZIN A. (1997). The solution of the S1 RNA binding domain: a member of an ancient nucleic acid-binding fold. *Cell*, 88: 235–242.
- CAHOON A., HARRIS F. und STERN D. (2004). Analysis of developing maize reveals two mRNA stability classes correlating with RNA polymerase type. *EMBO Rep.*, 5: 1–6.
- CAMPBELL E., KORZHEVA N., MUSTAEV A., MURAKAMI K., NAIR S., GOLDFARB A. und DARST S. (2001). Structural mechanisms for rifampicin inhibition of bacterial RNA polymerase. *Cell*, 104: 901–912.
- CANNON G., WARD L., CASE C. und HEINHORST S. (1999). The 68 kDa DNA compacting nucleoid protein from soybean chloroplasts inhibits DNA synthesis *in vitro*. *Plant Mol. Biol.*, 39: 835–845.
- CHA F., SHA F., CHIN K. und CHOU S. (2003). Binding of actinomycin to single-stranded DNA of sequence motifs d(TGTCT(n)G) and d(TGT(n)TGCT). *Biophys. J.*, 81: 432–439.
- CHANG C., SHEEN J., BLIGNY M., NIWA Y., LERBS-MACHE S. und STERN D. (1999). Functional analysis of two maize cDNAs encoding T7-like RNA polymerases. *Plant Cell*, 11: 911–926.
- CHEN H., LEGAULT P., GLUSHKA J., OMICHINSKI J. und SCOTT R. (2000). Structure of a (Cys)<sub>3</sub>His zinc ribbon, a ubiquitous motif in archaeal and eukaryal transcription. *Protein Sci.*, 9: 1743–1752.
- CHI-HAM C., KEATON M., CANNON G. und HEINHORST S. (2002). The DNA-compacting protein DCP68 from soybean chloroplasts is ferredoxin:sulfite reductase and co-localizes with the organellar nucleoid. *Plant Mol. Biol.*, 49: 621–631.
- CONAWAY R., KONG S. und CONAWAY J. (2003). TFIIS and GreB: two like-minded transcription elongation factors with sticky fingers. *Cell*, 114: 272–274.
- CRAMER P. (2002). Multisubunit RNA polymerases. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 12: 89–97.
- CRAMER P., BUSHNELL D. und KORNBERG R. (2001). Structural basis of transcription: RNA polymerase II at 2.8 Å resolution. *Science*, 292: 1863–1876.
- DOUCE R., HOLTZ B. und BENSON A. (1973). Isolation and properties of the envelope of spinach chloroplasts. *J. Biol. Chem.*, 248: 7215–7222.
- DUNN J. und STUDIER F. (1983). Complete nucleotide sequence of bacteriophage T7 DNA and the locations of T7 genetic elements. *J. Mol. Biol.*, 166: 477–535.

- EBRIGHT R. (2000). RNA polymerase: structural similarities between bacterial RNA polymerase and eukaryotic RNA polymerase II. *J. Mol. Biol.*, 304: 687–698.
- EIBL C., ZOU Z., BECK A., KIM M., MULLET J. und KOOP H.U. (1999). *In vivo* analysis of plastid *psbA*, *rbcL* and *rpl32* UTR elements by chloroplast transformation: tobacco plastid gene expression is controlled by modulation of transcript levels and transcription efficiency. *Plant J.*, 19: 333–345.
- EMANUEL C., WEIHE A., GRANER A., HESS W. und BÖRNER T. (2004). Chloroplast development affects expression of phage-type RNA polymerases in barley leaves. *Plant J.*, 38: 460–472.
- ERIE D. (2002). The many conformational states of RNA polymerase elongation complexes and their role in regulation of transcription. *Biochim. Biophys. Acta*, 1577: 224–239.
- FAIRBANKS G., STECK T. und WALLACH D. (1971). Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry*, 10: 2606–2617.
- FALK J. (1994). Funktionelle und molekulare Charakterisierung eines plastidären Transkriptionskomplexes während der Chloroplasten-Biogenese im Primärblatt der Gerste. Dissertation, Fachbereich Biologie der Universität Hamburg.
- FALK J., SCHMIDT A. und KRUPINSKA K. (1993). Characterization of plastid DNA transcription in ribosome deficient plastids of heat-bleached barley leaves. *Plant Physiol.*, 141: 176–181.
- FISH R. und KANE C. (2002). Promoting elongation with transcript cleavage stimulatory factors. *Biochim. Biophys. Acta*, 1577: 187–307.
- FLING S. und GREGERSON D. (1986). Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high molecular tris buffer system without urea. *Anal. Biochem.*, 155: 83–88.
- GARG P. (2002). Molecular characterization of the *et1* gene of *Zea mays* L. Dissertation, Fachbereich Biologie der Universität Hamburg.
- GHOSH S., GEPSTEIN S., GLICKI B., HEIKKILA J. und DUMBROFF E. (1989). Thermal regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase and ribulose-1-5-bisphosphate carboxylase in C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> plants native to hot temperature climates. *Plant Physiol.*, 90: 1298–1304.
- GNATT A., CRAMER P., FU J., BUSHNELL D. und KORNBERG R. (2001). Structural basis of transcription: an RNA polymerase II elongation complex at 3.3 Å resolution. *Science*, 292: 1876–1882.
- GRAY M. (1989). The evolutionary origins of organelles. *Trends Genet.*, 5: 294–299.

- GRUISSEM W., ELSNER-MENZEL C., LATSHAW S., NARITA J., SCHAFFER M. und ZURAWSKI G. (1986a). A subpopulation of spinach chloroplast tRNA genes does not require upstream promotor elements for transcription. *Nucleic Acids Res.*, 14: 7541–7556.
- GRUISSEM W., GREENBERG B., ZURAWSKI G. und HALLICK R. (1986b). Chloroplast gene expression and promotor identification in chloroplast extracts. *Meth. Enzymol.*, 118: 253–270.
- GRUISSEM W. und TONKYN J. (1993). Control mechanisms of plastid gene expression. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 12: 19–55.
- GU W. und REINES D. (1995). Variation in the size of the nascent RNA cleavage products as a function of transcript length and elongation competence. *J. Biol. Chem.*, 270: 30441–30447.
- HAGLER J. und SHUMAN S. (1993). Nascent cleavage by purified ternary complexes of Vaccinia RNA polymerase. *J. Biol. Chem.*, 268: 2166–2173.
- HAHN S. und ROBERTS S. (2000). The zinc ribbon domains of the general transcription factors TFIIB and Brf: conserved functional surfaces but different roles in transcription initiation. *Genes Dev.*, 14: 719–730.
- HAJDUKIEWICZ P., ALLISON L. und MALIGA P. (1997). The two RNA polymerases encoded by the nuclear and plastid compartments transcribe distinct groups of genes in tobacco plastids. *EMBO J.*, 13: 4041–4048.
- HAKIMI M., PRIVAT I., VALAY J. und 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., LIPPER C., RICHARDS O. und RUTTER W. (1976). Isolation of a transcriptionally active chromosome from chloroplasts of *Euglena gracilis*. *Biochemistry*, 15: 3039–3045.
- HANAOKA M., KANAMARU K., TAKAHASHI H. und TANAKA K. (2003). Molecular genetics analysis of chloroplast gene promoters on SIG2, a nucleus-encoded sigma factor for the plastid-encoded RNA polymerase. *Nucleic Acids Res.*, 31: 7090–7098.
- HANNA M. (1989). Photoaffinity cross-linking methods for studying RNA-protein interactions. *Meth. Enzymol.*, 180: 383–409.
- HAUSNER W., LANGE U. und MUSFELD M. (2000). Transcription factor S, a cleavage induction factor of the archeal RNA polymerase. *J. Biol. Chem.*, 275: 12393–12399.
- HEDTKE B., BÖRNER T. und WEIHE A. (1997). Mitochondrial and chloroplast phage-type RNA polymerases in *Arabidopsis*. *Science*, 277: 809–811.

- HEDTKE B., BÖRNER T. und WEIHE A. (2000). One RNA polymerase serving two genomes. *EMBO Reports*, 1: 435–440.
- HEDTKE B., LEGEN J., WEIHE A., HERRMANN R. und 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. und WEIHE A. (1999). Green fluorescence protein as a marker to investigate targeting of organellar RNA polymerases in higher plants *in vivo*. *Plant J.*, 17: 557–561.
- HEINS L. und SOLL J. (1998). Chloroplast biogenesis: Mixing the prokaryotic and the eukaryotic? *Curr. Biol.*, 8: 215–217.
- HESS W. und BÖRNER T. (1999). Organellar RNA polymerases of higher plants. *Int. Rev. of Cytol.*, 190: 1–59.
- HESS W., PROMBONA A., FIEDER B., SUBRAMANIAN A. und 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.
- VON HIPPEL P. (1998). An integrated model of the transcription complex in elongation, termination and editing. *Science*, 281: 660–665.
- HU J. und BOGORAD L. (1990). Maize chloroplast RNA polymerase: The 180-, 120-, and 38-kilodalton polypeptides are encoded in chloroplast genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 1531–1535.
- HU J., TROXLER R. und BOGORAD L. (1991). Maize chloroplast RNA polymerase: the 78-kilodalton polypeptide is encoded by the plastid *rpoC1* gene. *Nucleic Acids Res.*, 19: 3431–3434.
- HÜBSCHMANN T. und BÖRNER T. (1998). Characterization of transcript initiation sites in ribosome-deficient barley plastids. *Plant Mol. Biol.*, 36: 493–496.
- HUMBECK K., MELIS A. und KRUPINSKA K. (1994). Effects of chilling on chloroplast development in barley primary foliage leaves. *J. Plant Physiol.*, 143: 744–749.
- IGLOI G. und KÖSSEL H. (1992). The transcriptional apparatus of chloroplasts. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 10: 525–558.
- IKEDA T. und 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. und LERBS-MACHE S. (1997). Organ-specific transcription of the *rrn*-operon in spinach plastids. *J. Biol. Chem.*, 272: 13676–13682.

- IZBAN M. und LUSE D. (1992). The RNA polymerase II ternary complex cleaves the nascent transcript in a 3'-5' direction in the presence of elongation factor TFIIS. *Genes Dev.*, 6: 1342–1356.
- IZBAN M. und LUSE D. (1993). SII-facilitated transcript cleavage in RNA polymerase II complexes stalled early after initiation occurs in primarily dinucleotide increments. *J. Biol. Chem.*, 268: 12864–12873.
- JEON C., YOON H. und AGARWAL K. (1994). The transcription factor TFIIS zinc ribbon dipeptide Asp-Glu is critical for stimulation of elongation and RNA cleavage by RNA polymerase II. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 9106–9110.
- JEON S., ROSE A. und MEIER I. (2003). MFP1 is a thylakoid-associated, nucleoid-binding protein with a coiled-coil structure. *Nucleic Acids Res.*, 31: 5175–5185.
- JOYCE C. und STEITZ T. (1994). Function and structure relationships in DNA polymerases. *Annu. Rev. Biochem.*, 63: 777–822.
- KABEYA Y., HSHIMOTO K. und SATO N. (2002). Identification and characterization of two phage-type RNA polymerase cDNAs in the moss *Physcomitrella patens*: implication of recent evolution of nuclear-encoded RNA polymerase of plastids in plants. *Plant Cell Physiol.*, 43: 245–255.
- KANEKO T., SATO S., KOTANI H., TANAKA A., ASAMIZU E., NAKAMURA Y., MIYAJIMA N., HIROSAWA M., SUGIURA M., SASAMOTO S., KIMURA T., HOSOUCHE T., MATSOUCHE T., MURAKI A., NAKAZAKI N., NARUO K., OKUMURA S., SHIMPO S., TAKEUCHI C., WADA T., WATANABE Y., YAMADA M., YASUDA M. und TABATA S. (1996). Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. *DNA Res.*, 3: 109–136.
- KAPOOR S. und SUGIURA M. (1999). Identification of two essential sequence elements in the nonconsensus type II *PatbP* promoter using plastid transcription extracts from cultured tobacco BY-2 cells. *Plant Cell*, 11: 1799–1810.
- KASSAVETIS G. und GEIDUSCHEK E. (1993). RNA polymerase marching backward. *Science*, 259: 944–945.
- KATZ Y. und DANON A. (2002). The 3'-untranslated region of chloroplast *psbA* mRNA stabilizes binding of regulatory proteins to the leader of the message. *J. Biol. Chem.*, 277: 18665–18669.
- KETTENBERGER H., ARMACHE K. und CRAMER P. (2003). Architecture of the RNA polymerase II-TFIIS complex and implication for mRNA cleavage. *Cell*, 114: 347–357.
- KHANNA N., LAKHANI S. und TEWARI K. (1991). Photoaffinity labelling of the pea chloroplast transcriptional complex by nascent RNA *in vitro*. *Nucleic Acids Res.*, 19: 4849–4855.

- KIDD G. und BOGORAD L. (1980). A facile procedure for purifying maize chloroplast RNA polymerase from whole cell homogenates. *Biochim. Biophys. Acta*, 609: 14–30.
- KIM K. und LEE H. (2004). Complete chloroplast genome sequences from Korean ginseng (*Panax schinseng* Nees) and comparative analysis of sequence evolution among 17 vascular plants. *DNA Res.*, 11: 247–261.
- KOBAYASHI T., TAKAHARA M., MIYAGISHIMA S., KUROIWA H., SASAKI N., OHTA N., MATSUZAKI M. und KUROIWA T. (2002). Detection and localization of a chloroplast encoded HU-like protein that organizes chloroplast nucleoids. *Plant Cell*, 14: 1579–1589.
- KOHN W., MANT C. und HODGES R. (1997).  $\alpha$ -helical protein assembly motifs. *J. Biol. Chem.*, 272: 2583–2585.
- KOULICH D., ORLOVA M., MALHOTRA A., SALI A., DARST S. und BORUKHOV S. (1997). Domain organization of *Escherichia coli* transkript cleavage factors GreA and GreB. *J. Biol. Chem.*, 272: 7201–7210.
- KRAUSE K. (1999). Untersuchungen zur Zusammensetzung und Funktion des plastidären Transkriptionsapparates unter besonderer Berücksichtigung des 'Transkriptionsaktiven Chromosoms' (TAC). Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.
- KRAUSE K., BERG S. und 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. und KRUPINSKA K. (2000). Molecular and functional properties of highly purified transcriptionally active chromosomes from spinach chloroplasts. *Physiol. Plant.*, 109: 188–195.
- KRAUSE K., MAIER R., KOFER W., KRUPINSKA K. und 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: 1022–1030.
- 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. und 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.

- KUROIWA T. (1991). The replication, differentiation and inheritance of plastids with emphasis on the concept of organelle nuclei. *Int. Rev. Cytol.*, 128: 1–62.
- KUSUMI K., YARA A., MITSUI N., TOZAWA Y. und IBA K. (2004). Characterization of a rice nuclear-encoded plastid RNA polymerase gene *OsRpoTp*. *Plant Cell Physiol.*, 45: 1194–1201.
- LAEMMLI U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680–685.
- LAHIRI S.D. und ALLISON L. (2000). Complementary expression of two plastid-localized  $\sigma$ -like factors in maize. *Plant Physiol.*, 123: 883–894.
- LANGE U. und HAUSNER W. (2004). Transcriptional fidelity and proofreading in Archaea and implications for the mechanisms of TFS-induced RNA cleavage. *Mol. Microbiol.*, 52: 1133–1143.
- LAPTENKO O., LEE J., LOMAKIN I. und BORUKHOV S. (2003). Transcript cleavage factors GreA and GreB act as transient catalytic components of RNA polymerase. *EMBO J.*, 22: 6322–6334.
- LEBRUN M., BRIAT J. und LAULHERE J. (1986). Characterization and properties of the spinach chloroplast transcriptionally active chromosome isolated at high ionic strength. *Planta*, 169: 505–512.
- LEECH R., RUMSBY M. und THOMSON W. (1973). Plastid differentiation, acyl lipid, and fatty acid changes in developing green maize leaves. *Plant Physiol.*, 52: 240–245.
- LEGEN J., KEMP S., KRAUSE K., PROFANTER B., HERRMANN R. und MAIER R. (2002). Comparative analysis of plastid transcription profiles of entire chromosomes from tobacco attributed to wild-type and PEP-deficient transcription machineries. *Plant J.*, 31: 171–188.
- LERBS S., BRÄUTIGAM E. und MACHE R. (1988). DNA-dependent RNA polymerase of spinach chloroplast: characterization of  $\alpha$ -like and  $\sigma$ -like polypeptides. *Mol. Gen. Genet.*, 211: 459–464.
- LERBS S., BRÄUTIGAM E. und PARTHIER B. (1985). Polypeptides of DNA-dependent RNA polymerase of spinach chloroplasts: characterization by antibody-linked polymerase assay and determination of sites of synthesis. *EMBO J.*, 4: 1661–1666.
- LERBS-MACHE S. (1993). The 110-kDa polypeptide of spinach plastid DNA-dependent RNA polymerase: single-subunit enzyme or catalytic core of multimeric enzyme complexes? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 5509–5513.

- LIERE K., KADEN D., MALIGA P. und BÖRNER T. (2004). Overexpression of phage-type RNA polymerase RpoTp in tobacco demonstrates its role in chloroplast transcription by recognizing a distinct promoter type. *Nucleic Acids Res.*, 32: 1159–1165.
- LIERE K. und 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. und MALIGA P. (2001). Plastid RNA polymerases. In: Regulation of photosynthesis (B. Andersson und E. Aro, Hg.). Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, 29–49.
- LINK G. (1996). Green life: control of chloroplast gene transcription. *Bio Essays*, 18: 465–471.
- LIVIN J., KRUMMEL B. und CHAMBERLIN M. (1987). Isolation and properties of transcribing ternary complexes of *Escherichia coli* RNA polymerase positioned at a single template base. *J. Mol. Biol.*, 196: 85–100.
- LURIN C., ANDRES C., AUBOURG S., BELLAOUI M., BITTON F., BRYERE C., CABOCHE M., DEBAST C., GUALBERTO J., HOFFMANN B., LECHARNY A., LE RET M., MARTIN-MAGNIETTE M., MIREAU H., PEETERS N., RENOU J., SZUREK B., TACONNAT L. und SMALL I. (2004). Genome-wide analysis of Arabidopsis pentatricopeptide repeat proteins reveals their essential role in organelle biogenesis. *Plant Cell*, 16: 2089–2103.
- MAGEE A. und KAVANAGH T. (2002). Plastid genes transcribed by the nucleus encoded plastid RNA polymerase show increased transcript accumulation in transgenic plants expressing a chloroplast-localized phage T7 RNA polymerase. *J. Exp. Bot.*, 53: 2341–2349.
- MALIGA P. (1998). Two plastid RNA polymerases of higher plants: an evolving story. *Trends Plant Sci.*, 3: 3–6.
- MANNING J., WOLSTENHOLME D., RYAN R., HUNTER J. und RICHARDS O. (1971). Circular chloroplast DNA from *Euglena gracilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 68: 1169–1173.
- MÄNNISTÖ R., GRAHN A., BAMFORD D. und BAMFORD J. (2003). Transcription of bacteriophage PM2 involves phage-encoded regulators of heterologous origin. *J. Bacteriol.*, 185: 3278–3287.
- MÄNNISTÖ R., KIVELÄ H., PAULIN L., BAMFORD D. und BAMFORD J. (1999). The complete genome sequence of PM2, the first lipid-containing bacterial virus to be isolated. *Virology*, 262: 355–363.

- MARTIN W. und HERRMANN G. (1998). Gene transfer from organelles to the nucleus: how much, what happens, and why? *J. Plant Physiol.*, 118: 9–17.
- MARTIN W., RUJAN T., RICHLI E., HANSEN A., CORNELSEN S., LINS T., LEISTER D., STOEBE B., HASEGAWA M. und PENNY D. (2002). Evolutionary analysis of *Arabidopsis*, cyanobacterial, and chloroplast genomes reveals plastid phylogeny and thousands of cyanobacterial genes in the nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99: 12246–12251.
- MATHEWS D. und DURBIN R. (1990). Tagetitoxin inhibits RNA synthethis directed by RNA polymerases from chloroplasts and *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 265: 493–498.
- McFADDEN G. (1999). Endosymbiosis and evolution of the plant cell. *Opin. Plant Biol.*, 2: 513–519.
- MEIER I., PHELAN T., GRUISSEM W., SPIKER S. und SCHNEIDER D. (1996). MFP1, a novel plant filament-like protein with affinity for matrix attachment region DNA. *Plant Cell*, 8: 2105–2115.
- MIYAGI T., KAPOOR S., SUGITA M. und SUGIURA M. (1998). Transcript analysis of the tobacco plastid operon *rps2/atpI/H/F/A* reveals the existence of a non-consensus type II (NCII) promotor upstream of the *atpI* coding sequence. *Mol. Gen. Genet.*, 257: 299–307.
- MOLINEUX I. (2001). No syringes please: ejection of phage T7 DNA from the virion is enzyme driven. *Mol. Microbiol.*, 40: 1–8.
- MORDEN C., WOLFE K., DEPAMPHILIS C. und PALMER J. (1991). Plastid translation and transcription genes in a non-photosynthetic plant: intact, missing and pseudo genes. *EMBO J.*, 10: 3281–3288.
- MORIN P., AWREY D., EDWARDS A. und ARROWSMITH C. (1993). Elongation factor TFIIS contains three structural domains: solution structure of domain II. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 10604–10608.
- MÜLLER L. (2000). Vergleichende Charakterisierung des Transkriptionsapparates in Plastiden verschiedener Pflanzen. Diplomarbeit, Botanisches Institut der CAU Kiel.
- MURAKAMI S., KONDO Y., NAKANO T. und SATO F. (2000). Protease activity of CND41, a chloroplast nucleoid DNA-binding protein, isolated from cultured tobacco cells. *FEBS Lett.*, 468: 15–18.
- NAKAMURA T., SCHUSTER G., SUGIURA M. und SUGITA M. (2004). Chloroplast RNA-binding and pentatricopeptide proteins. *Biochem. Soc. Trans.*, 32: 571–574.
- NAKANO T., MURAKAMI S., SHOJI T., YOSHIDA S., YAMADA Y. und SATO F. (1997). A novel protein with DNA binding activity from tobacco chloroplast nucleoids. *Plant Cell*, 9: 1673–1682.

- NARITA J., RUSHLOW K. und HALLICK R. (1985). Characterization of a *Euglena gracilis* chloroplast RNA polymerase specific for ribosomal RNA genes. *J. Biol. Chem.*, 260: 11194–11199.
- NUDLER E. (1999). Transcription elongation: structural basis and mechanisms. *J. Mol. Biol.*, 288: 1–12.
- OLDENBURG D. und BENDICH A. (2004). Changes in the structure of DNA molecules and the amount of DNA per plastid during chloroplast development in maize. *J. Mol. Biol.*, 344: 1311–1330.
- OLMSTED V., AWREY D., KOTH C., SHAN X., MORIN P., KAZANIS S., EDWARDS A. und ARROWSMITH C. (1998). Yeast transcription elongation factor (TFII2), structure and function. I: NMR structural analysis of the minimal transcriptionally active region. *J. Biol. Chem.*, 35: 22589–22594.
- OPALKA N., CHLENOV M., CHACON P., RICE W., WRIGGERS W. und DARST S. (2003). Structure and function of the transcription elongation factor GreB bound to bacterial RNA polymerase. *Cell*, 114: 335–345.
- ORLOVA M., NEWLANDS J., DAS A., GOLDFARB A. und BORUKHOV S. (1995). Intrinsic transcript cleavage of RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 4596–4600.
- PALMER J. (1990). Contrasting moves and tempos of genome evolution in land plant organelles. *Trends Genet.*, 6: 115–120.
- PALMER J. (1991). Plastid chromosomes: structure and evolution. In: The molecular biology of plastids (L. Bogorad und I. Vasil, Hg.), 7a Aufl. Academic Press, San Diego, 5–53.
- PFALZ J. (2004). Identifizierung und Charakterisierung von Komponenten im transkriptionsaktiven Chromosom (TAC). Dissertation, Biologisch-Pharmazeutische Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena.
- PFANNSCHMIDT T. und LINK G. (1994). Separation of two classes of plastid DNA-dependent RNA polymerases that are differentially expressed in mustard (*Sinapis alba* L.) seedlings. *Plant Mol. Biol.*, 25: 69–81.
- PFANNSCHMIDT T. und 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. und LINK G. (2000). The multisubunit chloroplast RNA polymerase A from mustard (*Sinapis alba*) L. *Eur. J. Biochem.*, 267: 253–261.

- POULSEN C. (1983). The barley chloroplast genome: physical structure and transcriptional activity *in vivo*. *Carlsberg Res. Comm.*, 48: 57–80.
- PRIVAT I., HAKIMI M., BUHOT L., FAVORY J. und LERBS-MACHE S. (2003). Characterization of *Arabidopsis* plastid sigma-like transcription factors SIG1, SIG2 and SIG3. *Plant Mol. Biol.*, 51: 385–399.
- RAJASEKHAR V., SUN E., MEEKER R., WU B.W. und TEWARI K. (1991). Highly purified pea chloroplast RNA polymerase transcribes both rRNA and mRNA genes. *Eur. J. Biochem.*, 195: 215–228.
- RAJASEKHAR V. und TEWARI K. (1995). Analysis of the extent of immunological relatedness between a highly purified pea chloroplast functional RNA polymerase and *Escherichia coli* RNA polymerase. *J. Plant Physiol.*, 145: 427–436.
- RAMESH S., SANTA KUMARI A. und REDDY A. (1984). Photoacoustic and physiological studies on a maize mutant: a delay in leaf pigment synthesis in virescent seedlings. *Biochim. Intl.*, 9: 121–128.
- REINES D. (1992). Elongation factor-dependent transcript shortening by template-engaged RNA polymerase II. *J. Biol. Chem.*, 267: 3795–3800.
- REISS T. und LINK G. (1985). Characterization of transcriptionally active DNA-protein complexes from chloroplasts and etioplasts of mustard (*Sinapis alba* L.). *Eur. J. Biochem.*, 148: 813–823.
- RICHTER U., KIESSLING J., HEDTKE B., DECKER E., RESKI R., BÖRNER T. und 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.
- RIS H. und PLAUT W. (1962). Ultrastructure of DNA-containing areas in the chloroplasts of *Chlamydomonas*. *J. Cell. Biol.*, 13: 383–391.
- RUDD M., IZBAN M. und LUSE D. (1994). The active site of RNA polymerase II participates in transcript cleavage within arrested ternary complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 8057–8061.
- RUSHLOW K.E., OROZCO E., LIPPER C. und HALLICK R. (1980). Selective *in vitro* transcription of *Euglena* chloroplast ribosomal RNA genes by a transcriptionally active chromosome. *J. Biol. Chem.*, 255: 3786–3792.
- SAKAI A., SAITO C., INADA N. und KUROIWA T. (1998). Transcriptional activities of the chloroplast-nuclei and proplastid-nuclei isolated from tobacco exhibit different sensitivities to tagetitoxin: implication of the presence of distinct RNA polymerases. *Plant Cell Physiol.*, 39: 928–934.

- SAMBROOK J., FRITSCH E. und MANIATIS T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. 2 Aufl. Cold Spring Harbor Press, New York.
- SANGEETHA H., RAMESH S., JAYARAM C. und REDDY A. (1986). Studies on chlorophyll and protein accumulation in thylakoids and chloroplast development in virescent seedlings of maize mutants. *Biochem. Intl.*, 12: 181–188.
- SANGEETHA H. und REDDY A. (1991). Genetical and biochemical analysis of the *etched1 (et)* mutant of *Zea mays* L. *Maydica*, 36: 343–354.
- SASTRY S. und ROSS B. (1997). Nuclease activity of T7 RNA Polymerase and the heterogeneity of transcription elongation complexes. *J. Biol. Chem.*, 272: 8644–8652.
- SATO N., NAKAYAMA M. und HASE T. (2001). The 70-kDA major DNA-compacting protein of the chloroplast nucleoid is sulfite reductase. *FEBS Lett.*, 487: 347–350.
- SATO N., OHSHIMA K., WTANABE A., OHTA N., NISHIYAMA Y., JOYARD J. und DOUCE R. (1998). Molecular characterization of the PEND protein, a novel bZIP protein present in the envelope membrane that is the site of nucleoid replication in developing plastids. *Plant Cell*, 10: 859–872.
- SATO N. und OHTA N. (2001). DNA-binding specificity and dimerization of the DNA-binding domain of the PEND protein in the chloroplast envelope membrane. *Nucleic Acids Res.*, 29: 2244–2250.
- SATOH J., BABA K., NAKAHIRA Y., TSUNOYAMA Y., SHIINA T. und TOYOSHIMA Y. (1999). Developmental stage-specific multi-subunit plastid RNA polymerases in wheat. *Plant J.*, 18: 407–415.
- SCHIMPER A. (1883). Über die Entwicklung der Chlorophyllkörner und Farbkörper. *Botanische Zeitung*, 41: 105–112, 121–131, 137–146, 153–162.
- SEKIMIZU K., KOBAYASHI N., MIZUNO D. und NATORI S. (1976). Purification of a factor from Ehrlich ascites tumor cells specifically stimulating RNA polymerase II. *Biochemistry*, 15: 5064–5070.
- SEKINE K., HASE T. und SATO N. (2002). Reversible DNA compaction by sulfite reductase regulates transcriptional activity of chloroplast nucleoids. *J. Biol. Chem.*, 277: 24399–24404.
- SERINO G. und MALIGA P. (1993). RNA polymerase subunits encoded by the plastid *rpo* genes are not shared with the nucleus-encoded plastid enzyme. *J. Plant Physiol.*, 117: 1165–1170.
- SEVERINOV K. (2001). T7 RNA polymerase transcription complex: What you see is not what you get. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98: 5–7.

- SHILHATIFARD A., CONAWAY R.C. und CONAWAY J. (2003). The RNA polymerase II elongation complex. *Annu. Rev. Biochem.*, 72: 693–715.
- SHINOZAKI K., OHME M., TANAKA M., WAKASUGI T., HAYASHIDA N., MATSBAYASHI T., ZAITA N., CHUNWONGSE J., OBOKATA J., YAMAGUCHI-SHINOZAKI K., OHTO C., TORAZAWA K., MENG B., SUGITA M., DENO H., KAMOASHIRA T., YAMATA K., KUSUDA J., TAKAIWA F., KATO A., THODOH N., SHIMADA H. und SUGIURA M. (1986). The complete sequence of the tobacco chloroplast genome: its gene organization and expression. *EMBO J.*, 5: 2043–2049.
- SILHAVY D. und MALIGA P. (1998). Plastid promoter utilization in a rice embryogenic cell culture. *Curr. Genet.*, 34: 67–70.
- DA COSTA E SILVA O., LORBIECKE R., GARG P., MÜLLER L., WASSMANN M., LAUERT L., SCANLON M., HSIA A., SCHNABLE P., KRUPINSKA K. und WIENAND U. (2004). The *etched1* gene of *Zea mays* (L.) encodes a zinc ribbon protein that belongs to the transcriptionally active chromosome (TAC) of plastids and is similar to the transcription factor TFIIS. *Plant J.*, 38: 923–939.
- SILVA-FILHO M. (2003). One ticket for multiple destinations: dual targeting of proteins to distinct subcellular locations. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 6: 589–595.
- SMALL I. und PEETERS N. (2000). The PPR motif - a TPR-related motif prevalent in plant organellar proteins. *Trends Biochem. Sci.*, 25: 46–47.
- SMITH H. und BOGORAD L. (1974). The polypeptide subunit structure of the DNA-dependent RNA polymerase of *Zea mays*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 71: 4839–4842.
- SOLL J. und TIEN R. (1998). Protein translocation into and across the chloroplastic envelope membranes. *Plant Mol. Biol.*, 38: 191–207.
- SOPPA J. (2001). Basal and regulated transcription in archaea. *Adv. Appl. Microbiol.*, 50: 171–217.
- SOSUNOVA E., SOSUNOV V., KOZLOV M., NIKIFOROV V., GOLDFARB A. und MUSTAEV A. (2003). Donation of catalytic residues to RNA polymerase active center by transcription factor GreB. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100: 15469–15474.
- SPARKOWSKI J. und DAS A. (1990). The nucleotide sequence of *greA*, a suppressor gene that restores growth of an *Escherichia coli* RNA polymerase mutant at high temperature. *Nucleic Acids Res.*, 18: 6443–6448.
- SRIRAMAN P., SILHAVY D. und MALIGA P. (1998). Transcription from heterologous rRNA operon promoters in chloroplast reveals requirement for specific activating factors. *Plant Physiol.*, 117: 1495–1499.

- STADE K., RINKE-APPEL J. und BRIMACOMBE R. (1989). Site-directed cross-linking of mRNA analogues to the *Escherichia coli* ribosome; identification of 30S ribosomal components that can be cross-linked to the mRNA at various points 5' with respect to the decoding site. *Nucleic Acids Res.*, 17: 9889–9908.
- STADLER L. (1940). Gene list and linkage map of corn (maize). *Maize Genet. Coop. News Lett.*, 14: 26–27.
- STAUBER E., FINK A., MARKERT C., KRUSE O., JOHANNIGMEIER U. und HIPPLER M. (2003). Proteomics of *Chlamydomonas reinhardtii* light-harvesting proteins. *Eukaryotic Cell*, 5: 978–994.
- STEINBERG T., MATHEWS S., DURBIN R. und BURGESS R. (1990). Tagetitoxin: a new inhibitor of eukaryotic transcription by RNA polymerase III. *J. Biol. Chem.*, 265: 499–505.
- STOEBE B., MARTIN W. und KOWALLIK K.V. (1998). Distribution and nomenclature of protein-coding genes in 12 sequenced chloroplast genomes. *Plant Mol. Bio. Repr.*, 16: 243–255.
- SUCK R. (1996). Charakterisierung des membranassoziierten Transkriptionskomplexes von Plastiden der Gerste (*Hordeum vulgare* L.). Dissertation, Fachbereich Biologie der Universität Hamburg.
- SUCK R. und KRUPINSKA K. (1996). Repeated probing of western blots obtained from coomassie brilliant blue-stained or unstained polyacrylamide gels. *Bio Techniques*, 21: 418–422.
- SUCK R., ZELTZ P., FALK J., ACKER A., KÖSSEL H. und KRUPINSKA K. (1996). Transcriptionally active chromosomes (TACs) of barley chloroplasts contain the  $\alpha$ -subunit of plastom-encoded RNA polymerase. *Curr. Genet.*, 30: 515–521.
- SUGIURA M. (1992). The chloroplast genome. *Plant Mol. Biol.*, 19: 149–168.
- SURRATT C., MILAN S. und CHAMBERLIN M. (1991). Spontaneous cleavage of RNA in ternary complexes of *Escherichia coli* RNA polymerase and its significance for the mechanism of transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 7983–7987.
- SUZUKI J., YTTERBERG A., BEARDSLEE T., ALLISON L., VAN WIJK K. und MALIGA P. (2004). Affinity purification of the tobacco plastid RNA polymerase and *in vitro* reconstitution of the holoenzyme. *Plant J.*, 40: 164–172.
- TAHIROV T., TEMIAKOV D., ANIKIN M., PATLAN V., MCALLISTER W., VASSYLYEV D. und YOKOYAMA S. (2002). Structure of a T7 RNA polymerase elongation complex at 2.9 Å resolution. *Nature*, 420: 43–50.

- TEWARI K. und GOEL A. (1983). Solubilization and partial purification of RNA-polymerase from pea chloroplasts. *Biochemistry*, 22: 2142–2148.
- TEWARI K. und WILDMAN S. (1969). Function of chloroplast DNA. II. Studies on DNA-dependent RNA polymerase activity of tobacco chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta*, 186: 358–372.
- THOMM M. (1996). Archaeal transcription factors and their role in transcription initiation. *FEMS Microbiol. Rev.*, 18: 5052–5060.
- TILLER K. und LINK G. (1993). 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.
- TOULMÉ F., MOSRIN-HUAMAN C., SPARKOWSKI J., DAS A., LENG M. und RAHMOUNI A. (2000). GreA and GreB proteins revive backtracked RNA polymerase *in vivo* by promoting transcript trimming. *EMBO J.*, 19: 6853–6859.
- UPTAIN S., KANE C. und CHAMBERLIN M. (1997). Basic mechanisms of transcript elongation and its regulation. *Annu. Rev. Biochem.*, 66: 117–172.
- VAISTIJ F., BOUDREAU E., LEMAIRE S., GOLDSCHMIDT-CLERMONT M. und ROCHAIX J. (2000). Characterization of Mbb1, a nucleus-encoded tetratricopeptide-like repeat protein required for expression of the chloroplast *psbB/psbT/psbH* gene cluster in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 14813–14818.
- WADA T., TSUNOYAMA Y., SHIINA T. und TOYOSHIMA Y. (1994). *In vitro* analysis of the light-induced transcription in the wheat *psbD/C* gene cluster using plastid extracts from dark-grown and short-term illuminated seedlings. *Plant Physiol.*, 104: 1259–1267.
- WEBER A. (1995). Molekulare Charakterisierung von Proteinen der inneren und äußeren Plastiden-Hüllmembran. Dissertation, Fachbereich Biologie der Bayrischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg.
- WEIHE A., HEDTKE B. und BÖRNER T. (1997). Cloning and characterization of a cDNA encoding a bacteriophage-type RNA polymerase from the higher plant *Chenopodium album*. *Nucleic Acids Res.*, 25: 2319–2325.
- WESSEL D. und FLÜGGE U. (1984). A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal. Biochem.*, 138: 141–143.
- WHITEHALL S., BARDELEBEN C. und KASSAVETIS G. (1994). Hydrolytic cleavage of nascent RNA in RNA polymerase III ternary transcription complexes. *J. Biol. Chem.*, 269: 2299–2306.
- WILLIAMS P. und BARKIN A. (2003). A chloroplast-localized PPR protein required for plastid ribosome accumulation. *Plant J.*, 36: 675–686.

- XIE G. und ALLISON L. (2002). Sequences upstream of the YRTA core region are essential for transcription of the tobacco *atpB* NEP promotor in chloroplasts *in vivo*. *Curr. Genet.*, 41: 176–182.
- YAMAZAKI H., TASAKA M. und SHIKANAI T. (2004). PPR motifs of the nucleus-encoded factor, PGR3, function in the selective and distinct steps of chloroplast gene expression in *Arabidopsis*. *Plant J.*, 38: 152–163.
- YOUNG D., ALLEN R., HARVEY A. und 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 H. und WHITLEY H. (1975). Deoxyribonucleic acid-dependent ribonucleic acid polymerases in the dimorphic fungus *Mucor rouxii*. *J. Biol. Chem.*, 250: 479–487.
- YURINA N., BELKINA G., KARAPETYAN N. und ODINTSOVA M. (1995). Nucleoids of pea chloroplasts: microscopic and chemical characterization, occurrence of histone-like proteins. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 36: 145–154.
- ZHANG G., CAMPBELL E.A., MINAKHIN L., RICHTER C., SEVERINOV K. und DARST S. (1999). Crystal structure of *Thermus aquaticus* core RNA polymerase at 3.3 Å resolution. *Cell*, 98: 811–824.

# Anhang

```

-----
ZmET1      ----- MTTT ----- AAGHGCCWAGIPP--FAL-LPR
ZmZR1      ----- MTTT ----- AAGHGCCWAGIPP--FAL-LPR
HvZR1      -----          ----- AAAYGCSAAAAPS-----FPG
TaZR1      ----- MAAT ----- AAAYSCSAAAAALP-----FPG
AtZR1      ----- MANTAAGWSPV-LAPIYSPVNTKPIINFHF--SAS-FYK
HaZR1      ----- MATIASSLFS-----LPSLRATN-KTHRT-TTL-LPC
VvZR1      ----- MAATTCRALPT-IFFFHSSFTTTTLELPVP-STV-FFR
LeZR1      -----          ----- GNSKIFHN-FN-SCSSLSVTCTKTHVP-ICS-LQF
AmZR1      ----- MASISSTKIHS-FDCSLHSAPKTHIKTGAP-ISS-LPF
CrZR1      ----- MALALKARLACNHLQYHGSVEMLSCNTKPDAAHNGGFP
OsZR1      ----- MAASGELRRTV-----GDPGRGRPQIGAQREHVRSLPA
ZmZR2      --MESAAS--AAIATTSRS-LPLPFSSAPVHRRRRAAFLPVAAS-KRHDD
HvZR2      --MESVA-----IATTTTTRALPPAFPSEAHRLRRRAVXFVPGRSRLQAD
AtZR2      --MEATS-LSSAATIISSSSSPLSIFSPKKRTDSPPPRIIVRLSNKKEDK
PpZR1      -----          ----- DSLDKEEISPEAG-----AIVVSSLSTSLQTL
VvZR2      --MEA---LSSSATIIAASSSSPSIFSPRKR--DSPRFLRVNVSPKDNGN
LeZR2      --MET---LTSSAT---TTPSLSVFAPKSKHLSSRKIVKFSVSRKNNGN
GmZR2      MMEETLA-TSSSATLPS-SSSPFSIFPSRRRTSLSPKTLQFRLPSKRD-
OsZR2      --MESVAI-----ATTSRSLPLPPFSSNRRCRRRASFLPVAASNRRHHD
HUMAN_TF2S -----          ----- MEDEVVRF
-----

```

```

-----
ZmET1      --ILSTGRET-----PPPRAS-LV
ZmZR1      --ILSTGRET-----PPPRAS-LV
HvZR1      --SPFARRS-----PPSRVR--L
TaZR1      --SPFARRS-----PPSRVH--L
AtZR1      PPRPFYKQ-----QNPISALHRSK
HaZR1      --PNFLQPN-----LTLEFSRLGTSY
VvZR1      PKTRFSRLR-----VFPTTVAPKY
LeZR1      P-SSFRSNSYR-----FCIKSTRSSTLY
AmZR1      --SQFSRPNFG-----LKFEHLRLRSCY
CrZR1      AVASFTSNR-----ASPLFALCSQV
OsZR1      --ASTATSSGGHN-----GKGLPPPRLRPAI
ZmZR2      DKEAAKGSSEPRREPTSLA----PYGLSISP-----LSKDAAMGLVV
HvZR2      RRRRGGRRSRFQAAVLVFGGRANRPRAVRQSPSR--PFSKDAAMGLVM
AtZR2      DYDPQHSESN-----SSS-----LFRNRT-----LSNDEAMGLVL
PpZR1      S-----KDEAMGIIIL
VvZR2      DSDVR-SES-----DESSLVP-----ILTNRT-----LSKDAAMGLVL
LeZR2      ESDLQ-SDAN---DNISIVP-----IFNNPT-----LSKDAAMGLVL
GmZR2      --DARDSDSN-----QNNLP-----ILSDRCLSLSPSKDAAMGLVL
OsZR2      DDDEEVAKAHEP---TSLA-----SYGLSISP-----LSKDAAMGLVV
HUMAN_TF2S AKKMDKMVQKKNAASTRIGMSVNAIRKQSTDEEVTSLAKSLIKSPAITSQ
-----

```

```

-----
ZmET1    ASS-----SKLR-----ALAPRLRVSNR
ZmZR1    ASS-----SKLR-----ALAPRLRVSNR
HvZR1    ASS-----NSKPP-----R-----SPA
TaZR1    ASS-----NPKLG-----KPVPSLRASYR
AtZR1    ITRV-----IEVVT-----PKQRNR
HaZR1    INRK-----GSKQ-----VVI
VvZR1    GFRV-----LAAFV-----FRDGNF
LeZR1    GRRR-----ASEHL-----FRLPVI
AmZR1    KKNK-----GLEQC-----FRMPVI
CrZR1    SLQVQK-----SMHS-----MRRGYC
OsZR1    ASSRVSFRRGFLEARGGKKEEGRGEANPPPQDGDDGCGVRLPGGCGGGAV
ZmZR2    SAAT-----GSG-----WTTGS
HvZR2    SAAT-----GSG-----WTTGS
AtZR2    SAAS-----VKG-----WTTGS
PpZR1    NAAG-----STAG-----WTTGS
VvZR2    SAAS-----VRG-----WTTDS
LeZR2    SAAN-----VRG-----WTTGS
GmZR2    SAAT-----GRG-----WTTGS
OsZR2    SAAT-----GRG-----WTTGS
HUMAN_TF2S  NSPEAREESTSSGNVSNRKDETNAKCREMLAAALRTGDDYIAIGADEEEL
    
```

*Antikörper*

```

-----S-DAVPSPT-----A-----
ZmET1    P-----RRLIVSASSSAGEANS-DAVPSPT-----AAIDIKLPRRSLL
ZmZR1    P-----RRLIVSASSSAGEANS-DAVPSPT-----AAIDIKLPRRSLL
HvZR1    R-----WRLYVCACSGEVGPDNASSAASPAE-----ASFIDIKLPRRSLL
TaZR1    R-----RRPHVRACSSSEVDPD-ASAASPAE-----ASFIDIKLPRRSLL
AtZR1    S-----FSVFGSLADDSKLNPDDEESNDSAEV--ASIDIKLPRRSLLQ
HaZR1    S-----CLVEDYS-----TAQGSSESNPG--ATIDLKLPGRNLL
VvZR1    E-----ANLELGPSVSFS-FHSNSVFDDFCSE--ASIDIKLPRRSLLI
LeZR1    S-----CVVEDSSETQPDVAVNSASDSSKE--AVFDMKLPRRSLL
AmZR1    S-----CLVEDSSEPYSENEQSSISEPSQEG--ASIDLKLPRRSLL
CrZR1    R-----RLQAIASSPDVPGKDFSSLGSD--TETKIDLKLPRRRLQ
OsZR1    RGQRLPPPRAFPLRLARFLLLPQAHGGVSRVEGFVSPSTFDLNLPRRSLL
ZmZR2    G-----MEGP--PTASKAGGAGRPEVSTLPWS-----LFTKSPRRRMR
HvZR2    G-----MEGP--PTAG--GAANRPEVSTLPWS-----LFTKSPRRRMR
AtZR2    G-----MEGPSLPA-----KTDITVSTFPWS-----LFTKSPRRRMR
PpZR1    G-----LEGP-----SYPMEEAANEMPGP-----IFS KSPRRRMR
VvZR2    G-----MEGPSVAAA-EAGSSTERISTFPWS-----LFTKSPRRRMR
LeZR2    G-----MEGPPVAGS-DSESNIDQISTFPWS-----LFTKSPRRRMR
GmZR2    G-----MEGPSVAVGRDSESGTGNISTFPWS-----LFTKSPRRRMR
OsZR2    G-----MEGP--PKA--AGGDRPEVSTLPWS-----LFTKSPRRRMR
HUMAN_TF2S  GSQISRISNLKDAKPNLIRKNVLCGNLPPDLFAREAIREHQMAKTGGTQT
    
```

'zinc-ribbon'-Domäne

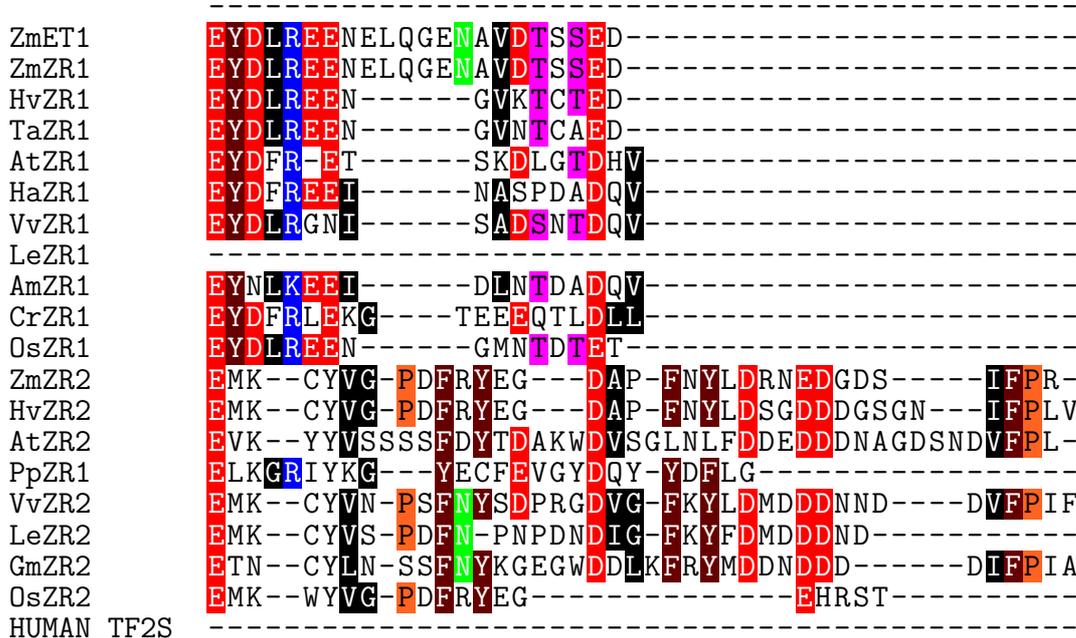
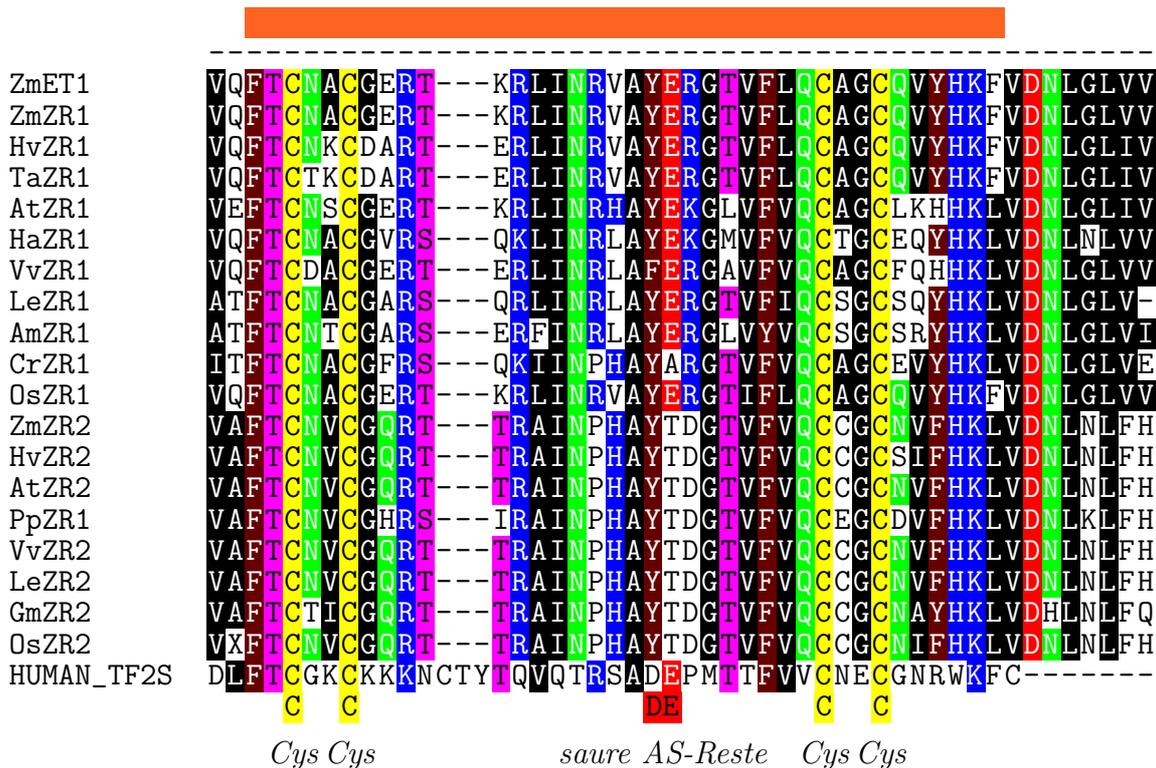


Abb. 36 : Alignment von ET1 mit bekannten Proteinen der ZR1- und der ZR2-Familie und TFIIS. Gleiche und aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften ähnliche Aminosäuren sind farbig unterlegt. Abkürzungen: Zm:*Zea mays*, Hv:*Hordeum vulgare*, Ta:*Triticum aestivum*, At:*Arabidopsis thaliana*, Ha:*Helianthus annuus*, Vv:*Vitis vinifera*, Le:*Lycopersicon esculentum*, Am:*Antirrhinum majus*, Cr:*Ceratopteris richardii*, Os:*Oryza sativa*, Pp:*Physcomitrella patens*, Gm:*Glycine max.* Antikörper: Sequenz für die Herstellung des Peptidantikörpers gegen ET1. AS: Aminosäure. Cys: Cystein

NCBI accession numbers: TaZR1:BK001719, HvZR1:BK001720, OsZR1:BK001721, HaZR1:BK001722, VvZR1:BK001723, LeZR1:BK001724, CrZR1:BK001725, AtZR1:BK001739 (At1g68730), AmZR1:BK001743, ZmZR2:BK001726, HvZR2:BK001727, OsZR2:BK001728, VvZR2:BK001729, GmZR2:BK001730, LeZR2:BK001731, AtZR2:BK001740 (At5g27280), PpZR2:BK001742, TFIIS:spP23193.

## Liste der eigenen Veröffentlichungen

da Costa e Silva, O., Lorbiecke, R., Garg, P., Müller, L., Waßmann, M., Lauert, L., Scanlon, M., Hsia, A.P., Schnable, P.S., Krupinska, K., Wienand, U. (2004). The *Etched1* gene of *Zea mays* (L.) encodes a zinc ribbon protein that belongs to the transcriptionally active chromosome (TAC) of plastids and is similar to the transcription factor TFIIS. *Plant J.* (38): 923-939

Weber, P., Fulgosi, H., Piven, I., Müller, L., Krupinska, K., Herrmann, R.G., Sokolenko, A. TCP34, a unique nuclear-encoded response regulator-like protein of higher plant chloroplasts. *Manuskript in Vorbereitung*

## Beiträge in Mitteilungsbanden von Tagungen

Müller, L., Lorbiecke, R., Garg, P., da Costa e Silva, O., Wienand, U., Krupinska, K. (2004). Characterization of ETCHED1, a putative elongation factor of the transcriptional apparatus of plastids. *Mitteilungsband der Jahrestagung der Deutschen Botanischen Gesellschaft*, Braunschweig

Sokolenko, A., Weber, P., Fulgosi, H., Piven, I., Müller, L., Krupinska, K., Herrmann, R.G. (2004). TCP34, an unique response regulator-like TPR protein of higher plant chloroplasts. *Mitteilungsband der Jahrestagung der Deutschen Botanischen Gesellschaft*, Braunschweig

Gebert, M., Lorbiecke, R., Garg, P., Waßmann, M., da Costa e Silva, O., Müller, L., Krupinska, K., Wienand, U. (2003). The ETCHED1 protein of *Zea mays* (L.) encodes a plastid protein with a zinc ribbon-like domain and similarity to eukaryotic transcription factors. *7<sup>th</sup> International Congress of Plant Molecular Biology*, Barcelona

Müller, L., Garg, P., Waßmann, M., Lorbiecke, R., Wienand, U., Krause, K., Krupinska, K. (2002). The ETCHED1 protein is associated with the transcriptionally active chromosome (TAC) of plastids. *Mitteilungsband der Jahrestagung der Deutschen Botanischen Gesellschaft*, Freiburg

## **Danksagung :**

Als erstes danke ich Frau Prof. Dr. Karin Krupinska für die Betreuung dieser Arbeit, ihr stetes Interesse an diesem spannenden Projekt und ihre Diskussionsfreudigkeit bei der Anfertigung dieser Arbeit. Vielen Dank!

Mein Dank geht auch an die Postdocs Jon, Bozena und Kirsten, die mir so manches Mal mit einer guten Idee auf die Sprünge geholfen haben. Ebenso danke ich René Lorbiecke in Hamburg und Anna Sokolenko in München für die gute Zusammenarbeit.

In Fragen des Laboralltags waren mir Susanne und Anke immer eine Hilfe, nicht zu vergessen Ulrike und im IsoLab Herr Dr. Künnemann.

Ein großer Dank geht natürlich an die Truppe im Doktorandenzimmer: An Gaby, Isa, Evelyn und besonders an Mario, sowie an alle weiteren Doktoranden, Diplomanden und Ehemaligen, mit denen ich eine tolle Zeit und viel Spaß - nicht nur im Labor - hatte!

Auch allen weiteren Mitgliedern der 'AG KK' und den AGs Schulz-Friedrich, Sauter und Kempken danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Ich danke auch all meinen Freunden in und außerhalb von Kiel, mit denen ich meine Studienzeit verleben konnte: Flo, Elke, Nicole, Marco, Sascha, Andi, Wolfgang, Michi, Isa, Heiko, Tini, Roland, Sylvia, Staudinger und noch vielen mehr.

Katrin, Dir danke ich ganz besonders für Deine Geduld und Dein Verständnis während der Anfertigung dieser Arbeit! Danke und für unsere gemeinsame, leider oft knappe Zeit, in der ich meine Arbeit auch mal vergessen konnte.

Ich danke vor allem auch meiner Mutter und meinem Bruder, die mich auch in schweren Zeiten immer unterstützt und meine Begeisterung für die Biologie geteilt haben.

Diese Arbeit wurde gefördert von der Zentralen Kommission zur Förderung des wissenschaftlichen und des künstlerischen Nachwuchses der CAU Kiel.

## Lebenslauf

# Lenard Müller

### Persönliche Daten

Geburtsdatum 15.04.1975  
Geburtsort Hannover  
Staatsangehörigkeit deutsch

### Schulbildung

1981 - 1985 Grundschule Oldau / Ovelgönne  
1985 - 1987 Orientierungsstufe Hambühren  
1987 - 1994 Hölty Gymnasium Celle  
Abschluß: Abitur am 08.06.1994

Jul. 1994 - Sep. 1995 Zivildienst im Landheim der Humboldtschule Hannover

### Studium

Okt. 1995 - Nov. 1999 Studium der Biologie an der CAU Kiel  
Hauptfach Botanik, Nebenfächer Mikrobiologie, Biochemie  
Jan. 2000 - Dez. 2000 Diplomarbeit am Botanischen Institut der CAU Kiel;  
Arbeitsgruppe Prof. K. Krupinska  
Apr. 2001 - Sep. 2001 wissenschaftlicher Angestellter am Botanischen Institut  
im Rahmen eines Projektes der Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe  
seit Okt. 2001 Arbeiten zur Promotion im Fach Botanik an der CAU Kiel  
unter Betreuung von Prof. Dr. K. Krupinska

# Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß die vorliegende Arbeit nach Inhalt und Form und die ihr zugrunde liegenden Versuche meine eigene Arbeit sind. Es wurden - abgesehen von der Beratung durch meine akademischen Lehrer - keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet. Wörtlich oder inhaltlich aus anderen Quellen entnommene Textstellen sind als solche kenntlich gemacht.

Diese Arbeit wurde weder ganz noch in Auszügen an einer anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt. Ferner erkläre ich hiermit, daß ich noch keine früheren Promotionsversuche unternommen habe.

Teile dieser Arbeit sind in folgenden Publikationen enthalten:

da Costa e Silva, O., Lorbiecke, R., Garg, P., Müller, L., Waßmann, M., Lauert, L., Scanlon, M., Hsia, A.P., Schnable, P.S., Krupinska, K., Wienand, U. (2004). The *Etched1* gene of *Zea mays* (L.) encodes a zinc ribbon protein that belongs to the transcriptionally active chromosome (TAC) of plastids and is similar to the transcription factor TFIIS. *Plant J.* (38): 923-939

Weber, P., Fulgosi, H., Piven, I., Müller L., Krupinska, K., Herrmann, R.G., Sokolenko, A. TCP34, a unique nuclear-encoded response regulator-like protein of higher plant chloroplasts. *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

---

Lenard Müller