

Untersuchungen zur Genexpression in
Amyloplasten der Kartoffel
(*Solanum tuberosum* L.)
und
Ansätze zur Plastidentransformation

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

vorgelegt von:

Mario Brosch
November 2005

Referentin: Prof. Dr. Karin Krupinska

Koreferent/in:

Tag der mündlichen Prüfung:

Zum Druck genehmigt:

Kiel, den

Der Dekan

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen und Symbole	V
1 Einleitung	1
1.1 Evolution und Differenzierung von Plastiden	1
1.2 Plastidäre Genomorganisation	3
1.3 Regulation der Genexpression in Plastiden	5
1.3.1 Plastidäre Transkription	5
1.3.2 Posttranskriptionale Kontrollmechanismen in Plastiden	7
1.3.3 Translationale Kontrollmechanismen in Plastiden	9
1.4 Plastidentransformation	10
1.5 Zielsetzung	13
2 Material und Methoden	14
2.1 Chemikalien und Enzyme	14
2.2 Pflanzenmaterial und Anzucht	14
2.3 Plastidengenomklone und Oligonukleotide	15
2.4 Allgemeine Methoden	17
2.4.1 Pigmentbestimmung	17
2.4.2 Anzucht, Lagerung und Transformation von Bakterien	17
2.4.3 Klonierung von DNA-Fragmenten	19
2.4.4 Polymerase-Kettenreaktion	19
2.4.5 Restriktion von DNA mit Restriktionsendonukleasen	19
2.4.6 Präparation von Plasmid-DNA	20
2.4.7 Sequenzierung klonierter DNA-Fragmente	20
2.4.8 Fällung von Nukleinsäuren	21
2.4.9 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren	21
2.4.10 Gelaufreinigung von RNA	21
2.5 Isolierung von intakten Organellen	21
2.5.1 Isolierung von Chloroplasten	21
2.5.2 Mikroskopische Quantifizierung von Chloroplasten	22

2.5.3	Isolierung von Amyloplasten	23
2.5.4	Quantifizierung von Amyloplasten	24
2.5.5	Isolierung von Mitochondrien	25
2.6	Extraktion von Nucleinsäuren	26
2.6.1	Isolierung von DNA aus Pflanzenmaterial	26
2.6.2	Extraktion von RNA aus Blattmaterial	27
2.6.3	Extraktion von RNA aus Knollenmaterial	27
2.6.4	Phenol-Extraktion von RNA aus isolierten Organellen	28
2.7	Kapillartransfer und Hybridisierung von Nucleinsäuren	29
2.7.1	Kapillartransfer von Nucleinsäuren auf Membranen	29
2.7.2	Herstellung von 'Dot-Blot'-Filtern	29
2.7.3	Radioaktive Markierung von DNA-Sonden für die Hybridisierung	29
2.7.4	Hybridisierung von DNA-Membranen	30
2.7.5	Hybridisierung von RNA-Membranen	30
2.7.6	Mehrfachverwendung von Membranen	31
2.7.7	Detektion von Hybridisierungssignalen	31
2.8	Extraktion und Analyse von Proteinen	32
2.8.1	Extraktion von Proteinen aus Blättern und Chloroplasten	32
2.8.2	Extraktion von Proteinen aus Knollen und Amyloplasten	32
2.8.3	Bestimmung der Proteinkonzentration	32
2.8.4	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese von Proteinen	33
2.8.5	Färbung von Proteingelen	33
2.8.6	Trocknung von Proteingelen	33
2.8.7	Elektrotransfer von Proteinen auf Membranen 'Western-Blot'	34
2.8.8	Immunologischer Nachweis von Proteinen	34
2.9	Analyse der Transkription in Plastiden	35
2.9.1	'Run-on'-Transkription	35
2.9.2	'Primer-Extension'-Analyse	36
2.10	Analyse der RNA-Zusammensetzung in Plastiden	37
2.10.1	3'-Markierung von RNA	37
2.11	Analyse der Translation in Plastiden	37

2.11.1	Isolierung von polysomaler RNA	37
2.12	Transmissionselektronenmikroskopie	39
2.13	Plastidentransformation	40
2.13.1	Plastidentransformationskonstrukte	40
2.13.2	Plastidentransformation von Tabak	42
2.13.3	Plastidentransformation von Kartoffeln nach SIDOROV <i>et al.</i> (1999)	43
3	Ergebnisse	45
3.1	Analysen zur Genexpression von Amyloplasten	45
3.1.1	Isolierung intakter Amyloplasten aus Kartoffelknollen	45
3.1.2	Vergleichende Untersuchungen zur Transkription in Amyloplasten und Chloroplasten	50
3.1.3	Transkriptionsanalyse der einzelnen plDNA - Bereiche	52
3.1.4	Zusammenfassung der Transkriptionsanalysen	58
3.1.5	Analysen zur RNAP-Aktivität in Amyloplasten	60
3.2	Analyse der Transkriptzusammensetzung in Amyloplasten der Kartoffelknolle	63
3.3	Analysen zur Translation in Amyloplasten	71
3.3.1	Nachweis ribosomaler Proteine in Amyloplasten	71
3.3.2	Translationsaktivität in Amyloplasten	74
3.3.3	Nachweis translatierter Transkripte in Amyloplasten	76
3.4	Ultrastrukturelle Untersuchungen der Amyloplastenenentwicklung	80
3.5	Transformation von Plastiden	82
3.5.1	Vergleichende Plastidentransformation von Tabakpflanzen	83
3.5.2	Transformation von Plastiden in Kartoffelpflanzen	85
4	Diskussion	87
4.1	Plastidenisolierung	87
4.2	Genexpression in Amyloplasten der Kartoffelknolle	87
4.2.1	Transkription in Amyloplasten	88
4.2.2	Transkriptzusammensetzung und -stabilität in Amyloplasten	91
4.2.3	Translation in Amyloplasten	95

4.2.4	Plastidendifferenzierung	96
4.3	Plastidentransformation	99
4.4	Schlußfolgerung	100
5	Zusammenfassung	102
6	Summary	104
	Literaturverzeichnis	106
A	Anhang	122
A.1	Detaillierte Darstellung der Transkriptionsanalyse	122
A.2	Detaillierte Darstellung der Analysen zur Transkriptzusammensetzung . . .	126

Abkürzungen und Symbole

3-PGA	Phosphoglycerinaldehyd
AGPase	ADP-Glucose-Pyrophosphorylase
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BAP	6-Benzylaminopurine
BSA	Rinderserumalbumin
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
CTP	Cytidin-5'-triphosphat
dATP	Desoxy-Adenosin-5'-triphosphat
dCTP	Desoxy-Cytidin-5'-triphosphat
dGTP	Desoxy-Guanidin-5'-triphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxy-Thymidin-5'-triphosphat
ECL	'enhanced chemiluminescence'
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycoldiamintetraessigsäure
GTP	Guanidin-5'-triphosphat
HEPES	4(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-ethansulfonsäure
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
IR	'Inverted repeat'
Kb	Kilobasenpaare
Kda	Kilodalton
LSC	'Large single copy region'
MES	4-Morpholinethansulfonsäure
MOPS	4-Morpholinpropansulfonsäure
mRNA	'messenger'-RNA
NAA	1-Naphtalen-Essigsäure
NADH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
NADP	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NEP	nukleär kodierte RNA-Polymerase
NTP	Nukleosidtriphosphat
Nycodenz	N,N'-Bis(2,3-dihydroxypropyl)-5-[N-(2,3-dihydroxypropyl)acetamid] -2,4,6-triiodoisophthalamid

PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
PEP	plastidär kodierte RNA-Polymerase
PMSF	Phenylmethylylsulfonylfluorid
ptDNA	plastidäre DNA
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RNA	Ribonukleinsäure
RNAP	RNA-Polymerase
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
SLF	‘sigma like factor‘
SDS	Natriumdodecylsulfat
SD-Sequenz	‘Shine Dalgarno‘-Sequenz
TCA	Trichloressigsäure
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	transfer-RNA
UTP	Uridin-5‘-triphosphat
UTR	nicht translatierter Bereich
Vol.	Volumen
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht/Volumen

1 Einleitung

1.1 Evolution und Differenzierung von Plastiden

Die Plastiden sind die typischen Zellorganellen aller eukaryotischen, photoautotrophen Organismen. Sie besitzen wie die Mitochondrien eine doppelte Hüllmembran und können von der Pflanze nicht *de novo* synthetisiert werden, sondern entstehen immer durch Teilung. Nach der Endosymbiontentheorie stammen die Plastiden aus der Phagozytose eines Cyanobakteriums (SCHIMPER, 1883; GRAY, 1998). Durch die Endosymbiose einer eukaryotischen Zelle mit einem photosynthetisch aktiven Cyanobakterium entstand der Vorläufer der Pflanzenzelle (MC FADDEN, 1999). Im Laufe der Evolution wurde der überwiegende Teil des endosymbiontischen Genoms in den Kern transferiert. Der eukaryotische Wirt erhielt dabei zunehmend Kontrolle über den Endosymbionten (MARTIN und HERRMANN, 1998; MARTIN *et al.*, 2002).

Die Plastiden der höheren Pflanzen differenzieren sich in unterschiedliche Typen (Abb. 1). Man unterscheidet bei der Klassifizierung von Plastidentypen zwei Systeme, die auf unterschiedlichen Kriterien basieren. Das erste Prinzip der Plastidenklassifizierung beruht auf einem Vorschlag von SCHIMPER (1885), der die Farbe als Kriterium sah. Er unterscheidet die Leukoplasten, die weiss bzw. farblos sind, die grün gefärbten Chloroplasten und die gelb bis rot gefärbten Chromoplasten. Das zweite und ausführlichere System benennt die Plastiden nach ihrer Funktion (HERRMAN *et al.*, 1992). Hierbei werden die Plastiden in vier Gruppen unterteilt. Die erste Gruppe umfaßt die Chloroplasten, deren wichtigste Funktion die Photosynthese, bei der die Strahlungsenergie der Sonne in chemische Energie in Form von ATP und NADPH umgewandelt wird, ist. Die Energie- und Reduktionsäquivalente werden in den photosynthetisch aktiven Plastiden zur CO₂-Fixierung im Calvin-Zyklus verwendet. Eine weitere Differenzierungsform der Plastiden ist die Entwicklung zu Speicherplastiden. Hierbei unterscheidet man drei Typen von Speicherplastiden, die nach der Art der von ihnen gespeicherten Stoffe benannt sind. Man unterscheidet die stärkespeichernden Amyloplasten, die fettspeichernden Elaioplasten und die eiweisspeichernden Proteinoplasten. Der dritte Plastidentyp wird aufgrund seiner rötlich gefärbten Carotinoideinlagerungen als Chromoplast bezeichnet und ist vor allem in Früchten und Blüten zu finden. Als vierter

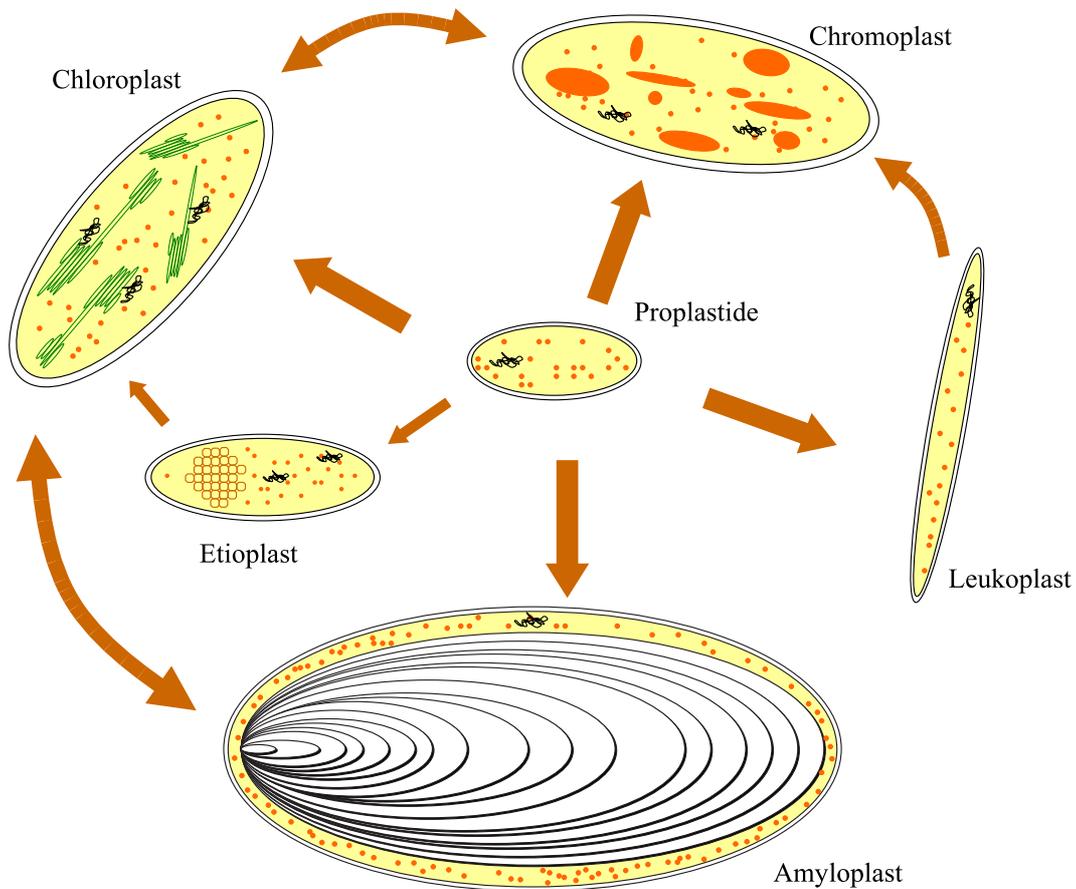


Abb. 1: Differenzierung von Plastiden nach HERRMAN *et al.* (1992).

Plastidentyp sind die undifferenzierten Proplastiden aufzuführen, die vorwiegend in meristematischen Geweben zu finden sind. Die Proplastiden werden auch Vorläuferplastiden genannt, was auf ihre Fähigkeit zurückzuführen ist, daß sie sich in alle Plastidentypen umwandeln können. Eine Sonderform der Plastiden sind die gelblich gefärbten Etioplasten, die sich entwickelnde Chloroplasten sind, bei denen aber aus Lichtmangel die Thylakoidbiogenese nicht ablaufen kann und in denen sich Vorstufen der Thylakoidmembran als Prolamellarkörper anhäufen. Die Differenzierung von Plastiden ist nicht endgültig. Chloroplasten behalten ihre Potenz, sich in Amylo-, Chromo- oder Elaioplasten umzuwandeln, wobei dieser Differenzierungsschritt auch in die entgegengesetzte Richtung verlaufen kann.

1.2 Plastidäre Genomorganisation

Plastiden besitzen aufgrund ihres endosymbiontischen Vorfahren ein eigenes Genom, das Plastom. Es wurde erstmals 1962 von RIS und PLAUT (1962) nachgewiesen und liegt als doppelsträngiges, kovalent geschlossenes Molekül vor (MANNING *et al.*, 1971). In der aktuellen Literatur werden allerdings neben ringförmigen auch lineare DNA-Moleküle diskutiert (BENDICH, 2004). Der Chloroplast von Mesophyllzellen enthält bis zu 100 Kopien des DNA-Moleküls, das auch in Chromoplasten und Amyloplasten nachgewiesen werden konnte (FALK *et al.*, 1974; WUTTKE, 1976; MACHEREL *et al.*, 1985).

Die Größe des Plastidengenoms schwankt je nach Pflanzenart zwischen 120 und 160 kb (WHITFIELD und BOTTOMLEY, 1983; PALMER, 1990). Ausnahmen sind zum einen parasitisch lebende, nicht photosynthetisch aktive Pflanzen wie *Epifagus virginiana* mit 70 kb Länge (WOLFE *et al.*, 1992) und zum anderen einige Leguminosenarten bzw. *Pelargonium* mit 220 kb Länge (PALMER, 1991). Das Plastom umfasst mit 100-140 Genen nur ca. 5-10 % des Kodierungspotential des prokaryotischen Vorläufers (MARTIN *et al.*, 2002), was auf einen Gentransfer vom Organell zum Zellkern oder einen Genverlust zurückzuführen ist. Die Transkripte der im Kern lokalisierten ursprünglich plastidären Gene werden im Cytosol translatiert und posttranslational über die beiden Hüllmembranen in die Plastiden importiert, was die Entwicklung eines Importapparates für Proteine notwendig machte (HEINS und SOLL, 1998).

Durch den gemeinsamen evolutionären Ursprung aller Plastiden ist die Struktur des Genoms relativ konserviert. Daher wird als Modell für die Struktur und Organisation des Plastoms in den meisten Fällen das von SHINOZAKI *et al.* (1986) vollständig sequenzierte Plastidengenom von Tabak (*Nicotiana tabacum*) herangezogen (Abb. 2).

Es besteht aus einer 86 686 bp und einer 18 571 bp großen Region mit Genen, die in einfacher Kopie vorliegen ('large single copy region', LSC bzw. 'small single copy region', SSC) und von einer 25 341 bp großen, duplizierten und invertierten Region ('inverted repeat', IRA bzw. IRB) voneinander getrennt werden (WAKASUGI *et al.*, 1998). Die Gene des plastidären Genoms lassen sich in 4 Gruppen einteilen. Die erste Gruppe umfasst 31 Gene, deren Produkte in die Photosynthese involviert sind. Die zweite Gruppe beinhaltet 58 Gene und kodiert für Komponenten des plastideneigenen genetischen Apparates.

zusammengefaßt. Zusätzlich wird in Plastiden eine kleine RNA (*sprA*), die keinen offenen Leserahmen für ein Protein besitzt, aktiv von ihrem eigenen Promotor transkribiert (VERA und SUGIURA, 1994).

1.3 Regulation der Genexpression in Plastiden

Die Regulation der Genexpression findet in den Plastiden auf unterschiedlichen Ebenen statt. Man unterscheidet die Kontrolle auf transkriptionaler, posttranskriptionaler und translationaler Ebene (MAYFIELD *et al.*, 1995; GRUISSEM und TONKYN, 1993). Abbildung 3 fasst die unterschiedlichen Kontrollmechanismen nach GRUISSEM und TONKYN (1993) zusammen.

1.3.1 Plastidäre Transkription

Die Transkription in Plastiden ist zunächst vom Methylierungsgrad der DNA abhängig. NGERNPRASIRTSIRI *et al.* (1988a) konnten einen direkten Zusammenhang zwischen methylierten Genloci auf dem Plastom von Amyloplasten des Bergahorns und der Transkriptionsaktivität nachweisen. Weiterhin konnte in Tomate gezeigt werden, daß der Methylierungsgrad der plDNA bei der Umwandlung von Chloroplasten in Chromoplasten zunimmt (KOBAYASHI *et al.*, 1990). Allerdings konnte kein Zusammenhang zwischen dem Methylierungsgrad der DNA und der Transkriptionsaktivität während der Entwicklung von Chloroplasten aus Gerste gefunden werden (KRUPINSKA, 1992). Diese Befunde lassen darauf schließen, daß eventuell eine gewebespezifische Methylierung der DNA vorliegt. Die plastidären Gene werden durch mindestens zwei verschiedene plastidenspezifische DNA-abhängige RNA-Polymerasen (RNAP) transkribiert. Während eine in ihrer Struktur der RNAP aus *E. coli* ähnlich ist und von Genen auf dem Plastom kodiert wird ('plastid encoded RNA polymerase', PEP) (HU und BOGORAD, 1990; HU *et al.*, 1991), ist die andere kernkodiert ('nuclear encoded RNA polymerase', NEP) und wird posttranslational in die Plastiden importiert (HEDTKE *et al.*, 1997; CHANG *et al.*, 1999; HEDTKE *et al.*, 1999). Im Unterschied zur PEP ist die NEP in allen Plastidentypen aktiv und auch in der Lage, das Plastidengenom in Pflanzen, die keine PEP synthetisieren, zu transkribieren (FALK *et al.*, 1993; KRAUSE *et al.*, 2000; LEGEN *et al.*, 2002). Zur Initiation der Transkription

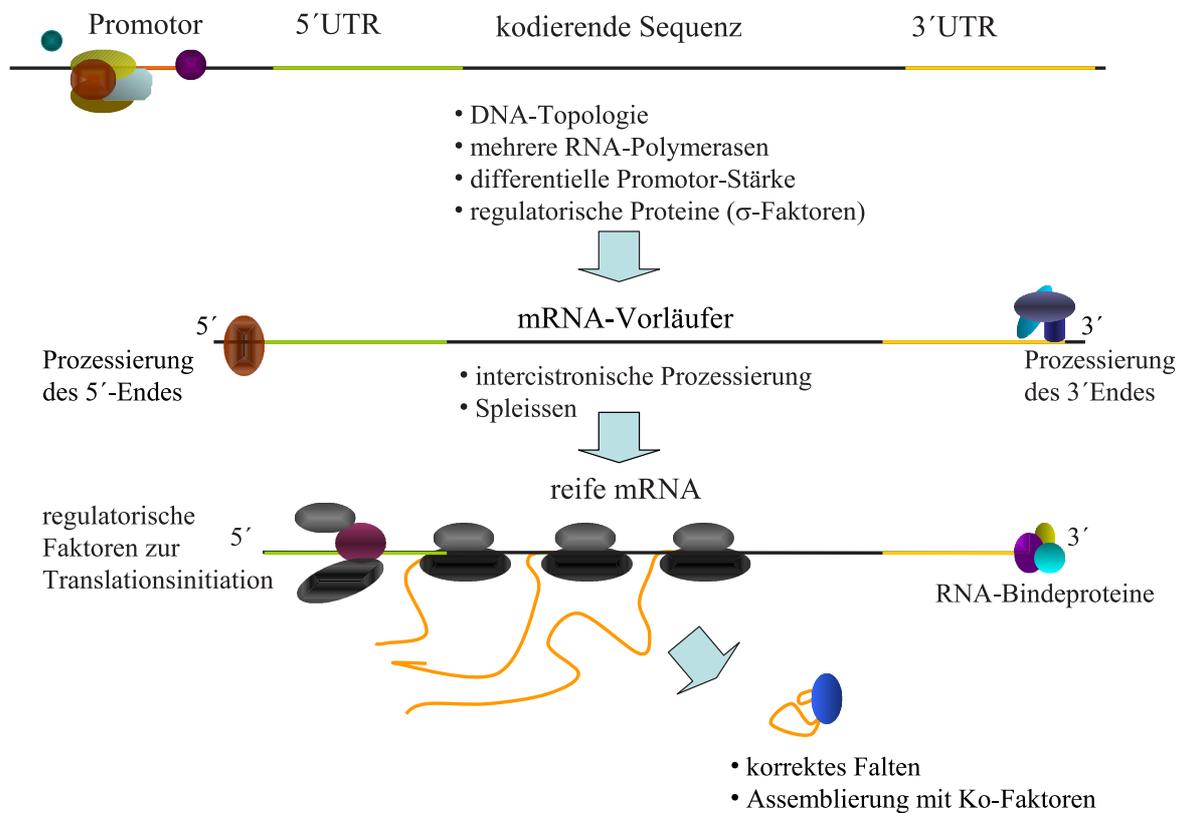


Abb. 3: Kontrollmechanismen der Genexpression in Plastiden nach GRUISSEM und TONKYN (1993).

benutzen beide RNAPs vollständig unterschiedliche Promotoren. Die PEP benötigt zur Initiation einen bakterienähnlichen -10/-35 σ^{70} -Promotor (HESS und BÖRNER, 1999) und einen bakterienähnlichen σ -Faktor, den 'sigma like factor' (SLF), der im Kern kodiert ist und posttranslational in die Plastiden importiert wird (TILLER *et al.*, 1991; TILLER und LINK, 1993). Bisher wurden verschiedene SLFs in *Arabidopsis thaliana*, Mais und Reis identifiziert (ISONO *et al.*, 1997; TANAKA *et al.*, 1997; YAO und ALLISON, 1998; LAHIRI *et al.*, 1999; TAN und TROXLER, 1999; TOZAWA *et al.*, 1998). Durch Untersuchungen von T-DNA-Insertionslinien von *Arabidopsis thaliana* konnte gezeigt werden, daß die differentielle Expression von einzelnen SLFs direkten Einfluß auf die Transkription in Chloroplasten

besitzt. So scheint der SLF AtSig2 bevorzugt die Promotorregionen einiger tRNAs zu erkennen (HANAOKA *et al.*, 2003; KANAMARU *et al.*, 2001).

Die NEP benötigt im allgemeinen Promotoren, die die Consensus-Sequenz YRTA aufweisen (Weihe und Börner 1999). Die Initiation der RNAP scheint ebenfalls von Transkriptionsfaktoren abhängig zu sein. In Spinat wird CDF2 als Transkriptionsfaktor, der die NEP an den ribosomalen Promotor rekrutiert und im Gegenzug die Initiation der PEP reprimiert, diskutiert (BLIGNY *et al.*, 2000). Zudem wurde kürzlich gezeigt, daß die NEP mit einer tRNA interagieren kann. Durch binden dieser tRNA wird die Transkriptionsaktivität der NEP reduziert (HANAOKA *et al.*, 2005).

Anhand der für die Transkription verantwortlichen Promotoren sind die plastidären Gene in drei verschiedene Klassen eingeteilt worden (HAJDUKIEWICZ *et al.*, 1997). Gene, die ausschließlich einen PEP-Promotor aufweisen gehören zur Klasse I, solche mit nur einem NEP-Promotor zur Klasse III. Alle Gene die beide Typen von Promotoren besitzen, werden in der Klasse II zusammengefaßt. In verschiedenen Modellen wird das Zusammenspiel der beiden RNAPs diskutiert. MULLET (1993) und MALIGA (1998) diskutieren eine entwicklungspezifische Regulation der beiden RNAPs. Dabei soll die NEP vorwiegend in Proplastiden aktiv sein und hier vor allem für die Synthese des genetischen Apparates sorgen. Die PEP übernimmt dagegen in Chloroplasten die Transkription der plastidären Gene, deren Produkte in die Photosynthese involviert sind. Eine von HESS und BÖRNER (1999) vorgestellte Theorie geht davon aus, daß NEP und PEP gemeinsam in den Chloroplasten vorliegen, wobei die NEP für die Transkription der Haushaltsgene verantwortlich ist und die PEP Photosynthesegene transkribiert. Durch Untersuchungen an Tabakpflanzen, die keine PEP mehr synthetisieren können, wurde allerdings gezeigt, daß die NEP grundsätzlich in der Lage ist, alle Plastidengene zu transkribieren (KRAUSE *et al.*, 2000).

1.3.2 Posttranskriptionale Kontrollmechanismen in Plastiden

Plastidäre RNAs sind nach ihrer Transkription einer Vielzahl von Prozessierungsprozessen ausgesetzt. Dazu gehören zum einen die Prozessierung von polycistronischen Transkriptionseinheiten und zum anderen die daran anschließende Reifung der Transkriptenden (SUGITA und SUGIURA, 1996; BARKAN und GOLDSCHMIDT-CLERMONT, 2000; MONDE *et al.*,

2000). Zusätzlich müssen aus einigen Transkripten Introns durch Spleißen entfernt werden. Der Großteil der reifen RNAs geht durch *cis*-Spleißen hervor, während die Reifung einiger Transkripte, z.B. *rps12*, durch *trans*-Spleißen erfolgt (FROMM *et al.*, 1986; HILDEBRANDT *et al.*, 1988). Mit Ausnahme eines Introns gehören alle anderen zu den Klasse II-Intronen, die zum korrekten Spleissen Ribosomen bzw. Translationaktivität benötigen (HESS *et al.*, 1994; HÜBSCHMANN *et al.*, 1996). Ein weiterer Aspekt der Reifung plastidärer Transkripte ist die posttranskriptionale Veränderung einzelner Transkripte. Bei diesem als RNA-Edierung bezeichneten Prozess wird ein Cytosinrest in einen Uracilrest umgewandelt. Durch Edierung können Startkodons gebildet werden oder Kodons für konservierte Aminosäuren in Proteinen hergestellt werden (BOCK, 2000). Im offenen Leserahmen der α -Untereinheit der plastidär kodierten RNAP wird durch Edierung das Kodon für einen konservierten Rest, der für die Aktivierung der RNAP wichtig ist, wiederhergestellt, was darauf schließen lässt, daß Edierung zudem die Transkriptionsaktivität in Plastiden beeinflusst (HIROSE *et al.*, 1999).

Neben der Reifung der plastidären Transkripte ist die Stabilisierung und ihr Abbau ein wichtiger Kontrollmechanismus in der Genexpression von Plastiden (MONDE *et al.*, 2000). Die RNA-Stabilität, definiert als die Zeit, in der die Hälfte der ursprünglichen Menge an Transkripten abgebaut wird, variiert zwischen einzelnen Transkripten. Als Determinanten werden die 5'- und 3'-UTRs verantwortlich gemacht. In verschiedenen Transkripten wurden Haarnadelstrukturen beobachtet, die die RNA vor exonukleolytischem Abbau schützen. Weiterhin konnte in *Chlamydomonas reinhardtii* gezeigt werden, daß Mutanten mit defekten nukleären Genen unterschiedliche Stabilitäten von plastidären Transkripten aufweisen. Die Zielelemente dieser Faktoren wurden in den 5'- und 3'-Bereichen der entsprechenden Transkripte identifiziert, woraus zu schließen ist, daß kernkodierte Faktoren eine wesentliche Rolle in der Stabilisierung von plastidären RNAs spielen (HERRIN und NICKELSEN, 2004; MONDE *et al.*, 2000; SCHUSTER *et al.*, 1999). Weiterhin spielt die Polyadenylierung in der Stabilität von plastidären Transkripten eine große Rolle. Während dieser Mechanismus cytosolische RNAs stabilisiert, ist er in Plastiden ein Signal zum Abbau (HAYES *et al.*, 1999; SCHUSTER *et al.*, 1999). Durch Hemmung der Adenylierung durch das ATP-Analogon Cordycepin akkumulierten die initialen Spaltprodukte der Transkripte von *psbA* und *rbcL* (LISITSKY *et al.*, 1997). Ein von MONDE *et al.* (2000) aufgestelltes Modell geht

davon aus, daß Endonukleasen die zum Abbau bestimmten mRNAs in der kodierenden Region bzw. vor der Haarnadelstruktur spalten. Der proximale Teil wird daraufhin polyadenyliert und dadurch zum Abbau durch 3'→5'-Exonukleasen markiert, während der distale Teil des Transkripts durch 5'→3'-Exonukleasen abgebaut wird.

1.3.3 Translationale Kontrollmechanismen in Plastiden

Die Translation in Plastiden findet, wie bei dem prokaryotischen Vorläufer an 70S Ribosomen statt, die sich aus einer 30S- und einer 50S- Untereinheit zusammensetzen. Die 30S ribosomale Untereinheit besteht aus 25 Proteinen, wovon 12 auf der plastidären DNA kodiert sind (YAMAGUCHI *et al.*, 2000). Dagegen sind von der 50S ribosomalen Untereinheit nur 8 der 33 Proteine in den Plastiden kodiert und 25 müssen posttranslational importiert werden (YAMAGUCHI und SUBRAMANIAN, 2000). In Prokaryoten initiiert die 30S ribosomale Untereinheit die Translation an Shine Dalgarno Sequenzen (SD), die die Konsensussequenz GGAGG besitzen und die sich konserviert an Position -7 ± 2 vom Startkodon im 5'UTR der mRNA befindet. In Plastiden besitzen nur wenige Transkripte diese Sequenz. Wenn sie vorhanden ist, befindet sie sich nicht in dem für Eubakterien konservierten Bereich, sondern befindet sich weiter vom Startkodon entfernt (SUGIURA *et al.*, 1998). In manchen Fällen wurden die regulatorischen prokaryotischen Elemente durch neue *cis*-Elemente ersetzt, die die Aufgabe der SD-Sequenzen komplett übernehmen oder mit ihnen zusammen die Translationsinitiation kontrollieren (HIROSE und SUGIURA, 1996). In anderen Transkripten findet man zusätzlich zur SD-Sequenz ähnliche Sequenzen, die nicht dem Konsensus entsprechen, die allerdings ebenfalls komplementär zur 16S ribosomalen RNA sind. An diesen Sequenzen findet bei den entsprechenden Transkripten die Translationsinitiation statt. Daher werden diese Elemente als funktionelle SD-Sequenzen bezeichnet (HIROSE und SUGIURA, 2004a). Bei den Transkripten, die keine SD- bzw. ähnliche-Sequenzen besitzen, wird ein dritter Mechanismus zur Translationsinitiation vermutet. Die Ribosomen binden im 5'-Bereich des Transkripts, rutschen am Transkript entlang in 5'-3'-Richtung zum Startkodon und bilden dort mit anderen Faktoren einen Initiationskomplex (HIROSE und SUGIURA, 2004b). Neben der Kontrolle auf Ebene der Initiation kann die Translation zusätzlich während der Elongation kontrolliert werden. Die Ribosomen können auf der

mRNA während der Elongation an spezifischen Stellen arretiert werden, was das kotranslationale Assemblieren mit Kofaktoren, die Membraninsertion und das korrekte Falten der naszierenden Polypeptide erleichtert (KIM *et al.*, 1991, 1994; STOLLAR *et al.*, 1994). Die Translation in Chloroplasten wird zudem durch andere Faktoren reguliert (z.B. Δ -pH der Thylakoidmembran, stromale ADP- bzw. Thioredoxinkonzentration) und kann auch von der Entwicklung abhängen (ZERGES, 2000). In *Chlamydomonas reinhardtii* wird zudem der CES-Prozess ('control by epistasy synthesis') diskutiert. Mit diesem Modell wird die koordinierte Expression der plastidären Multiproteinkomplexe erklärt, deren Gene in den Plastiden und im Kern vorliegen. Die Untereinheiten der Multiproteinkomplexe müssen in einem bestimmten Verhältnis zueinander vorliegen. Dies wird erreicht, indem die Translation der CES-Untereinheit gestoppt wird, bis der 'dominante' Assemblierungspartner zur Verfügung steht. Erst wenn dieser kotranslational assembliert, kann die Translation der CES-Untereinheit fortgeführt werden (CHOQUET und WOLLMAN, 2002). Ähnliche Mechanismen werden auch für die Plastiden Höherer Pflanzen diskutiert (ZERGES, 2000; RORDERMEL *et al.*, 1996).

1.4 Plastidentransformation

Die Plastidentransformation bietet gegenüber der Transformation des Kerngenoms einige Vorteile. Zum einen werden die Plastidengene in den meisten Kulturpflanzen ausschließlich maternal vererbt (DANIELL, 2002), was zur Folge hat, daß eine unkontrollierte Ausbreitung des Transgens über die Pollen verhindert wird. Zum anderen macht man sich in der Plastidentransformation die homologe Rekombination zu nutze, wodurch man in der Lage ist, das Transgen exakt im Genom zu positionieren. Somit vermeidet man die in der Kerntransformation beschriebenen Positionseffekte und eliminiert das Risiko der Integration von Vektorsequenzen, wie das für Kerntransformanten beschrieben ist (DANIELL *et al.*, 2002). Ein weiterer Vorteil sind die hohen Syntheseleistungen der transgenen Plastiden, die das fremde Protein bis zu einem Anteil von 46% am löslichen Gesamtprotein in Blättern akkumulieren können (DE COSA *et al.*, 2001).

Die erste Plastidentransformation in höheren Pflanzen erfolgte 1990 durch SVAB *et al.* (1990) unter Einsatz des biolistischen Gen-Transfers. Durch Rückkreuzungen der trans-

plastomischen Linien mit dem Wildtyp konnte in diesem Bericht die maternale Vererbung des Transgens belegt werden. Als Selektionsmarker wurde bei diesen Versuchen ein mutiertes Spectinomycin- und Streptomycinresistenz verleihendes 16SrDNA-Fragment verwendet. Bei der biolistischen Transformationsmethode werden mit DNA beladene Mikroprojektele unter Druck mit Helium-Gas so stark beschleunigt, daß sie in das zu transformierende Gewebe eindringen können. Eine Alternative zu dieser Methode bietet die durch Polyethylenglykol (PEG) vermittelte Transformation, bei der Protoplasten in Gegenwart von PEG spontan DNA aufnehmen und in ihr Genom inserieren (KOOP *et al.*, 1996).

Einen Durchbruch in der Plastidentransformation erzielten GOLDSCHMIDT-CLERMONT (1991), als sie erstmals das Aminoglykosid-3“-Adenyltransferasegen (*aadA*) aus *Escherichia coli* als Selektionsmarker in *Chlamydomonas reinhardtii* verwendeten. Das *aadA*-Genprodukt, die Aminoglykosid-3“-Adenyltransferase, adenyliert das Antibiotikum Spectinomycin und verhindert somit dessen inhibitorischen Effekt auf die 70S-Ribosomen. Das *aadA*-Gen wurde anschließend von SVAB und MALIGA (1993) ebenfalls für Tabak als Selektionsgen eingeführt und ist seitdem der wichtigste Selektionsmarker in der Plastidentransformation. Als weiterer Selektionsmarker konnte das *aph6*-Gen von *Acinetobacter baumannii*, das Resistenz gegen Kanamycin vermittelt, etabliert werden (HUANG *et al.*, 2002). DANIELL *et al.* (2001) berichten von dem ersten Selektionsmarker in der Plastidentransformation, der nicht auf der Selektion durch Antibiotika beruht. Die Autoren benutzen das *badh*-Gen aus Spinat, dessen Produkt, die Betainaldehyd-Dehydrogenase das für Pflanzen giftige Betainaldehyd in nichtgiftiges Glycinaldehyd umwandelt. Neben der Etablierung von Markergenen ohne Antibiotikaselektion wurden Strategien zur Eliminierung vorhandener Markergene nach erfolgter Selektion entwickelt (KLAUS *et al.*, 2004; HAJDUKIEWICZ *et al.*, 2001; IAMTHAM und DAY, 2000).

Ein typischer Plastidentransformationsvektor enthält in der Regel ein Selektionsgen und ein Zielgen, die beide jeweils unter der Kontrolle eines starken Promotors und 5‘- und 3‘-Bereichen, die eine hohe Translationseffizienz und RNA-Stabilität vermitteln, stehen. Die korrekte Insertion durch homologe Rekombination wird durch zur pDNA homologe Bereiche gewährleistet, die die Expressionskassette flankieren. Als Promotor wird in den häufigsten Fällen der -10/-35 σ^{70} des ribosomalen Operons bzw. der -10/-35 σ^{70} -Promotor

des Gens *psbA* verwendet, während die 5'- und 3'-Bereiche, der stark translatierten Plastidengene *psbA* und *rbcL* verwendet werden (MALIGA, 2003).

Bisher konnten mehr als 40 Transgene in Plastiden von Tabak transformiert und exprimiert werden. Allerdings gibt es bisher nur wenig Berichte über die erfolgreiche Transformation von Plastiden aus anderen Kulturpflanzen, wie Tomate, Sojabohne, Karotte oder Baumwolle (DANIELL *et al.*, 2005; RUF *et al.*, 2001). Weiterhin gibt es einen Bericht über die erfolgreiche Transformation von Rapspflanzen, die allerdings nicht homoplastomisch sind (HOU *et al.*, 2003) und zwei Berichte über die erfolgreiche Transformation von Kartoffelpflanzen (SIDOROV *et al.*, 1999; NGUYEN *et al.*, 2005). Diese Pflanzen zeigen zwar eine hohe Expression des fremden Proteins in Chloroplasten, aber eine nur geringe Akkumulation des Proteins in Amyloplasten. Bisher wurden in der Plastidentransformation Transformationskonstrukte verwendet, die ausschließlich für eine hohe Expression des Fremdgens in Chloroplasten optimiert sind. Daher wäre es für die spezifische Expression eines Fremdgens in Kartoffelknollen von Nutzen Konstrukte zu verwenden, die speziell für die Expression in Amyloplasten adaptiert sind.

1.5 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit soll geklärt werden, welche Plastidengene in Amyloplasten der Kartoffelknolle exprimiert werden. Die Expression der Plastidengene soll auf Ebene der Transkription, der Transkriptstabilität und der Translation untersucht werden. Parallel zu den Untersuchungen zur Genexpression sollen Versuche zur Erhöhung der Effizienz der Plastidentransformation von Kartoffelpflanzen durchgeführt werden. Im Anschluß daran sollen die gewonnenen Erkenntnisse über die Genexpression in Amyloplasten für eine gewebespezifische Expression von Transgenen in der Kartoffelknolle genutzt werden.

Für die geplanten Untersuchungen zur plastidären Genexpression ist es zunächst erforderlich, eine Methode zur Isolierung von intakten Amyloplasten aus Kartoffelknollen zu erarbeiten. Mit Transkriptionsanalysen mit den isolierten Amyloplasten soll geklärt werden, welche Gene in diesem Plastidentyp transkribiert werden. Da die Stabilität von Transkripten neben der Transkription ein weiterer entscheidender Faktor der Genexpressionskontrolle ist, sollen auch Untersuchungen über die Transkriptzusammensetzung in Amyloplasten durchgeführt werden. Um Aufschluß über die Translation zu erhalten, soll weiterhin überprüft werden, welche der transkribierten und akkumulierenden Transkripte mit Ribosomen assoziiert sind.

Eine Plastidentransformation von Kartoffelpflanzen wurde bisher nur zweimal gezeigt. In beiden Fällen war die Effizienz allerdings gering. Im Rahmen dieser Arbeit sollen zwei Transformationskonstrukte verglichen werden, die zum einen das Selektionsgen unter die Kontrolle des in vorangegangenen Arbeiten verwendeten PEP-Promotors des ribosomalen Operon und zum anderen unter der Kontrolle des vollständigen Promotor des ribosomalen Operons, der zusätzlich NEP-Elemente enthält, stellen. Diese Konstrukte sollen zunächst in der Modellpflanze Tabak getestet werden. Anschließend sollen die gewonnenen Erfahrungen auf die Plastidentransformation von Kartoffelpflanzen übertragen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Enzyme

Die verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Amersham (Freiburg), Duchefa (Haarlem, Niederlande), Fisher Scientific (Düsseldorf), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe) oder Sigma (München) bezogen und waren, soweit nicht anders vermerkt, von reiner Qualität. Die radioaktiven Nukleotide α - ^{32}P -CTP, α - ^{32}P -dCTP, 3'-5'- α -Bisphosphat-CTP wurden mit einer spezifischen Aktivität von 3000 Ci/mmol von der Firma Hartmann Analytik (Braunschweig) bezogen. Die verwendeten Enzyme stammten, soweit nicht anders vermerkt, von der Firma MBI Fermentas (St. Leon Rot).

2.2 Pflanzenmaterial und Anzucht

MS-Medium

0,75 % (w/v) Agar
 0,44 % (w/v) MS-Nährsalze M0245
 3 % (w/v) Saccharose
 pH 5,8

B5-Medium

0,75 % (w/v) Agar
 0,44 % (w/v) MS-Nährsalze M0231
 2 % Saccharose
 pH 5,8

Sterile Kulturen von Kartoffelpflanzen (*Solanum tuberosum* cv. Baltica) wurden von der Firma SakaRagis (Windeby) zur Verfügung gestellt. Die Pflanzen wurden in Kulturboxen auf B5-Medium vegetativ vermehrt und bei Bedarf auf 1/3 Sand, 2/3 Einheitserde umgesetzt und in einer Klimakammer bei einer PPFD von 200 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ und einem Licht/(10 h/24°C)/Dunkel (14 h/16°C) -Rhythmus kultiviert.

Samen von Tabak (*Nicotiana tabacum* cv. Petit Havanna) wurden vor der Aussaat mit 70% (v/v) Ethanol für 2 Min. gemischt. Anschließend wurden die Samen zweimal 3 Min. mit sterilem Wasser gewaschen, auf MS-Medium (MURASHIGE und SKOOK, 1962) ausgelegt und in einem Klimaschrank (RUMED, Laatzen) bei einer PPFD von 50-100 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ und einem Licht/Dunkel-Rhythmus von 16/8 h bei 24°C angezogen.

2.3 Plastidengenomklone und Oligonukleotide

Die für die vergleichenden Analysen der Transkription und Transkriptzusammensetzung von Chloroplasten und Amyloplasten verwendeten *Bam*H1-Fragmente der Tabak-plDNA lagen in pBR322 kloniert vor und sind von SUGIURA *et al.* (1986) beschrieben. Die Subklone und einige davon repräsentierten Gene sind in Tabelle 1 aufgelistet. Ein von diesen Subklonen nicht repräsentierter Bereich des Plastoms wurde mittels PCR unter Verwendung folgender Oligonukleotide amplifiziert und im Verlauf dieser Arbeit in pGEM[®]-T (Promega, Madison, Wi, USA) kloniert und als pNtPCR bezeichnet:

5'-ATT CAA CCT CTT GCT TG-3' (Position 1133071-113055)

5'-ACT GCG GTG ACG ATA CTG-3' (Position 109663-109680)

Tab. 1: Subklone der Tabak plDNA. Name, Größe und repräsentierte Gene sind angegeben (SUGIURA *et al.*, 1986).

Klon	Fragment name	Fragment gröÙe	einige repräsentierte Gene
pTBa1	Ba1	19,6 kb	<i>petA</i> , <i>psbF-trnP</i> , <i>rpl33</i> , 18, 20, <i>psbB-petD</i>
pTBa2	Ba2	19,1 kb	<i>ndhF</i> , <i>ndhD</i> , <i>psaC</i> , <i>ndhE,I,A,H</i> , <i>rps5</i>
pTBa5	Ba5	7,1 kb	<i>trnI</i> , <i>rrn23</i> , <i>rrn4,5</i> , <i>rrn5</i> <i>trnR</i> , <i>trnN</i>
pTB7	B7	10,9 kb	<i>rpoB</i> , <i>C1</i> , <i>C2</i>
pTB13	B13	10,4 kb	<i>rpl16</i> , <i>rps3</i> , <i>rpl22</i> , <i>rps19</i> <i>rpl2,23B</i> , <i>trnI</i>
pTB18	B18	9,9 kb	<i>trnL</i> , <i>ndhB</i> , <i>rps7,12</i> , <i>trnV</i> , <i>rrn16</i> , <i>trnI</i>
pTB19	B19	12,3 kb	<i>trnS</i> , <i>rps4</i> , <i>trnT,L,F,V,M</i> , <i>atpB,E</i>
pTB20	B20	17,3 kb	<i>trnE,Y,D</i> , <i>psbC,D</i> , <i>trnF,M</i> , <i>rps14</i> , <i>psaA,B</i>
pTB22	B22	4,8 kb	<i>accD</i> , <i>psaI</i>
pTB25	B25	16,0 kb	<i>trnK</i> , <i>matKI</i> , <i>trnS,G,R</i> , <i>atpA,f,I</i> , <i>accD</i> , <i>rps12</i>
pTB27	B27	7,0 kb	<i>trnV,M</i> , <i>atpB,E</i> , <i>rbcL</i> , <i>accD</i>
pTB28	B28	7,3 kb	<i>trnH</i> , <i>psbA</i> , <i>trnK,I</i> , <i>rpl2</i>
pTB29	B29	3,4 kb	<i>atpB</i> , <i>rbcL</i>
pPCR	PCR	3,3 kb	<i>orf350</i> , <i>ndhF</i> , <i>trnR</i> , <i>orf75</i>

Die in Tabelle 2 aufgeführten Oligonukleotide wurden zur Amplifikation von bestimmten

DNA-Fragmenten verwendet. Sie wurden entweder von der Firma Sigma-Genosys (Steinheim) bezogen oder lagen bereits in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Krupinska vor.

Tab. 2: Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten verwendete Oligonukleotide.

DNA-Fragment	Bezeichnung	Sequenz
Promotor der 16S rRNA	PEP-NEP-EcoRI	5' CCC CGG AAT TCC CAC GAG CGA ACG AGA ATG G 3'
	PEP-NEP-rev	5' CCC CGG ATA TCT TAC GCC AAG GTT GGG CTG C 3'
5'UTR <i>psbA</i>	UTR- <i>psbA</i> -Dra	5' CCT TTA AAA AGC CTT CCA TTT TCT ATT T 3'
	UTR- <i>psbA</i> -NcoI	5' GCC CAT GGT AAA ATC TTG GTT TAT TTA 3'
<i>rpl2</i>	<i>rpl2</i> for	5' TAG AGA TGT CTC CTA CGT TAC C 3'
	<i>rpl2</i> rev	5' TTT ACT ACG GCG ACG AAG 3'
<i>trnH</i>	<i>trnH</i> for	5' GGA GAG AAA ATC GAA TTA AAT TC 3'
	<i>trnH</i> rev	5' ATA GAC TTT TTT GTT TAC ATT ATA G 3'
<i>psbA</i>	<i>psbA</i> for	5' GAG CAA TAG CAC CCT CTT G 3'
	<i>psbA</i> rev	5' CTA GTG TGC TTG GGA GTC 3'
<i>trnK</i>	<i>trnK</i> for	5' CTC GTG TCA ACC AAG GT 3'
	<i>trnK</i> rev	5' AAT GCA AGC ACG GCT TG 3'
<i>matK</i>	<i>matK</i> for	5' GTG CTT GCA TTT TTC CAT TG 3'
	<i>matK</i> rev	5' CAA GTT CTT TCT TTG ACC T 3'
3' <i>rps12EII</i>	<i>rps12E2</i> for	5' CTC TGC CTT ACG TAA CGT TGC CAG AG 3'
	<i>rps12E2</i> rev	5' CGA TCC TTT ACT CCG ACA GCA TCT AG 3'
Charakterisierung der transplastomischen Pflanzen		
<i>aadA</i> - 3' <i>rps12</i>	<i>aadA</i> -for	5' GAA GCG GTT ATC GCC GAA G 3'
	3' <i>rps12</i> -rev	5' CAG GAA ACA GCT ATG ACC GGG TAA ATC CTT AAC 3'
IRD-800 markierter 'Primer' zur Bestimmung von Transkriptionsstarts		
	<i>pexB</i>	5' AGT TGC ATT ACT TAG AGC 3'

Die in Tabelle 3 aufgeführten Plasmide dienten als Sonden für die spezifische Detektion von Transkripten. Name, Größe, Restriktionsschnittstelle, verwendeter Vektor, sowie der Organismus, aus dem die DNA-Fragmente stammen, sind angegeben.

Tab. 3: Zur spezifischen Detektion von Transkripten verwendete Sonden.

Name	detektiertes Gen	Restriktionsschnittstelle	Vektor	Organismus
Hv205	16S rRNA	<i>Pst</i> I	pBR325	Gerste
Hvatp9	<i>atp9</i>	<i>Eco</i> 52I	pGEM [®] -T	Gerste
Strpl2	<i>rpl2</i>	<i>Eco</i> 52I	pGEM [®] -T	Kartoffel
SttrnH	<i>trnH</i>	<i>Eco</i> 52I	pGEM [®] -T	Kartoffel
StpsbA	<i>psbA</i>	<i>Eco</i> 52I	pGEM [®] -T	Kartoffel
SttrnK	<i>trnK</i>	<i>Eco</i> 52I	pGEM [®] -T	Kartoffel
StmatK	<i>matK</i>	<i>Eco</i> 52I	pGEM [®] -T	Kartoffel
St3' rps12EII	3' <i>rps12EII</i>	<i>Eco</i> 52I	pGEM [®] -T	Kartoffel

2.4 Allgemeine Methoden

2.4.1 Pigmentbestimmung

Der Nachweis von Pigmenten erfolgte nach LICHTENTHALER (1987) mittels Methanolextraktion. Die 2-3 cm langen Proben von Kartoffelsprossen wurden mit 2-3 ml Methanol aufgeköcht. Zur Verhinderung der Umsetzung von Chlorophyll zu Phaeophytin wurde dem Ansatz eine Spatelspitze Magnesiumhydroxidcarbonat hinzugefügt. Nach einer Zentrifugation (5 Min., 800 x g, RT) wurde der Überstand in einen Messkolben überführt. Dieser Vorgang wiederholte sich, bis die Segmente vollständig ausgebleicht waren. Danach wurde das Spektrum des Extrakts bei einer Wellenlänge von 700 nm bis zu einer Wellenlänge von 400 nm gegen Methanol als Blindwert aufgenommen.

2.4.2 Anzucht, Lagerung und Transformation von Bakterien

Für die Klonierung und Amplifikation von DNA-Fragmenten wurden die Vektoren pBlue-script (Stratagene, La Jolla, Ca, USA) und pGEM[®]-T (Promega, Madison, Wi, USA) verwendet. Rekombinante Plasmide wurden in dem Bakterienstamm DH5 α vermehrt.

Die Anzucht des *E. coli*-Stamms erfolgte in Gegenwart von 100 μ g Ampicillin bzw. 50 μ g Spectinomycin je 1 ml LB-Medium in einem Schüttelinkubator über Nacht bei 180 UpM und 37°C .

LB-Medium

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

Indikatorplatten

1,5 % (w/v)	Agar
100 $\mu\text{g/ml}$	Ampicillin
10 $\mu\text{g/ml}$	IPTG
40 $\mu\text{g/ml}$	X-Gal
in LB-Medium	

TCM-Puffer

10 mM	Tris/HCl pH 7,5
10 mM	CaCl ₂
10 mM	MgCl ₂

Für die Transformation wurden Bakterienzellen verwendet, die zuvor nach der Methode von MANDEL und HIGA (1970) chemisch kompetent gemacht und bei -80°C gelagert wurden. 10-20 μl Ligationsansatz wurden mit 50 μl TCM-Puffer versetzt und dieses Gemisch zu 100 μl Bakterienzellen gegeben. Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen einem einminütigen Hitzeschock bei 42°C unterzogen und sofort für zwei Min. auf Eis überführt. Anschließend wurden die Zellen mit 200 μl LB-Medium versetzt und 30 Min. in einem Schüttelinkubator bei 90 UpM und 37°C inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurden jeweils 160 μl Bakterienzellen auf einer Indikatorplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Die Anzucht von Bakterien, die rekombinante DNA enthielten, erfolgte über Nacht in 3 ml LB-Medium, das 100 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin enthielt, in einem Schüttelinkubator bei 180 UpM und 37°C . Diese Kulturen dienten entweder als Vorkulturen für die Anzucht von Bakterien in größerem Maßstab oder wurden zur Präparation von Plasmid-DNA (2.4.6) verwendet. Die Lagerung der Bakterien erfolgte entweder auf LB-Agarplatten bei 4°C oder bei -80°C in LB-Medium das 20 % (v/v) Glycerin enthielt.

2.4.3 Klonierung von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente konnten entweder mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion unter Verwendung spezifischer Oligonukleotide amplifiziert werden (2.4.4) oder aus bereits klonierten DNA-Fragmenten mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen gewonnen werden (2.4.5).

Die PCR-Produkte bzw. Restriktionsansätze wurden in einem Agarosegel aufgetrennt (2.4.9) und die gewünschten DNA-Fragmente mit dem NucleoTrap-Kit[®] der Firma Machery-Nagel (Düren) aus dem Gel eluiert.

Restriktionsfragmente mit überhängenden 5'- und 3'-Enden wurden direkt in den Vektor mit den komplementären Enden unter Verwendung von 1 U Ligase über Nacht bei 4°C ligiert. Bei nicht passenden Enden wurde vor der Ligation eine Auffüllreaktion mit 10 U Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I und 1 mM dNTP's in einem 20 µl-Ansatz für 15 Min. durchgeführt. PCR-Fragmente wurden mit Hilfe des pGEM[®]-T Vector der Firma Promega Corporation (Madison, Wi, USA) kloniert.

2.4.4 Polymerase-Kettenreaktion

Ein typischer PCR-Ansatz enthielt in einem Gesamt-Volumen von 50 µl 5-10 ng genomische DNA, 20 pmol jedes der beiden Oligonukleotide, jeweils 20 pmol dATP, dCTP, dGTP und dTTP, 4 mM MgCl₂ und 2 U Taq-Polymerase im 1x konzentrierten Puffer des Herstellers (MBI Fermentas, St. Leon Rot). Die Amplifikation erfolgte in der Regel in 35 mal wiederholten Zyklen, bestehend aus Denaturierung der DNA bei 95°, Bindung der Oligonukleotide bei einer Temperatur entsprechend den Eigenschaften der Oligonukleotide und Synthese des komplementären Stranges durch die Taq-Polymerase bei 72°C. Nach Abschluß der Zyklen wurde eine fünfminütige Inkubation bei 72°C angeschlossen. Die PCR-Reaktion wurde in einem Primus 96 Plus PCR-Gerät (MWG Biotech) durchgeführt.

Die Proben wurden nach den Amplifikations-Zyklen entweder sofort gelelektrophoretisch analysiert (2.4.9) oder bis zur Analyse bei -20°C gelagert.

2.4.5 Restriktion von DNA mit Restriktionsendonukleasen

DNA wurde sequenzspezifisch mit Restriktionsendonukleasen nach Angaben des Herstellers (MBI Fermentas, St Leon-Rot) hydrolysiert.

2.4.6 Präparation von Plasmid-DNA

Lysis-Puffer

50 mM	Glukose
25 mM	Tris/HCl pH 8
10 mM	EDTA

Die Präparation von Plasmiden in kleinem Maßstab erfolgte im Anklang an BIRNBOIM und DOLY (1979).

1,5 ml einer über Nacht angezogenen Kultur wurden bei 13000 x g 2 Min. sedimentiert und das Sediment in 100 μ l Lysis-Puffer resuspendiert. Nach einer fünfminütigen Inkubationszeit auf Eis wurden der Suspension 200 μ l 0,2 M NaOH/0,1 % ((w/v)) SDS zugegeben und diese dann 5 Min. auf Eis inkubiert. Anschließend wurden dem Ansatz 150 μ l Natrium-Acetat pH 4,8 hinzugefügt. Nach einem Zentrifugationsschritt (16000 x g, 10 Min.) wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt, die Nukleinsäuren durch Zugabe von 280 μ l Isopropanol gefällt und durch eine anschließende Zentrifugation (16000 x g, 10 Min.) sedimentiert. Nach einem Waschschrift mit 500 μ l 70 % (v/v) Ethanol wurden die Sedimente getrocknet, in 20 μ l H₂O aufgenommen und die verbliebene RNA durch Zugabe von 10 μ g RNaseA hydrolysiert.

Für die Präparation von Plasmid-DNA im großen Maßstab wurde das Nucleobond® PC100 der Firma Machery und Nagel nach Angaben des Herstellers verwendet.

2.4.7 Sequenzierung klonierter DNA-Fragmente

Klonierte DNA-Fragmente wurden mit Hilfe von IRD800-fluoreszenzmarkierten, vektor-spezifischen Oligonukleotiden (Invitrogen, Karlsruhe oder MWG Biotech, Ebersberg) sequenziert. Die PCR-basierte Kettenabbruchreaktion wurde mit dem 'Cycle Reader™ Auto DNA Sequencing Kit' (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) nach Angaben des Herstellers in einem Primus 96 Plus PCR-Gerät (MWG, Biotech) durchgeführt. Die Elektrophorese erfolgte über Nacht in einem denaturierendem Polyacrylamidgel (6 % Sequagel XR, Biozym, Hameln). Die Gelelektrophorese und die Datenaufzeichnung erfolgten in einem LiCor DNA

Sequenzierer (Model 4000 L, MWG, Biotech).

2.4.8 Fällung von Nukleinsäuren

Die Präzipitation von in wässriger Lösung vorliegenden Nukleinsäuren erfolgte nach Zugabe von 0,1 Vol. 3 M Natrium-Acetat pH 4,8 und 2,5 Vol. Ethanol während einer 30 minütigen Inkubation bei -80°C oder über Nacht bei -20°C . Anschließend wurden die präzipitierten Nukleinsäuren bei $16000 \times g$ für 10 Min. sedimentiert und das Sediment in 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, an Luft getrocknet und in Wasser aufgenommen.

2.4.9 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

Die Auftrennung von DNA zu präparativen und analytischen Zwecken in Agarosegelen sowie die Auftrennung von RNA in denaturierenden Formaldehyd - Agarosegelen erfolgte nach den von SAMBROOK *et al.* (1989) beschriebenen Methoden. Als Größenmarker dienten bei der DNA - Elektrophorese die GeneRulerTM 1KB - DNA - Leiter und bei der RNA - Elektrophorese die RNA Ladder, High RangeTM (MBI Fermentas St. Leon Rot).

2.4.10 Gelaufreinigung von RNA

Die RNA wurde in einem 1 %igen (w/v) Low - Melt - Agarosegel mit 20 mM Guanidinthiocyanat elektrophoretisch aufgetrennt. Nach kurzem Gellauf wurde die RNA großzügig ausgeschnitten und anschließend einer Phenol / Chloroform - Extraktion unterzogen.

2.5 Isolierung von intakten Organellen

2.5.1 Isolierung von Chloroplasten

Die Isolierung von intakten Chloroplasten erfolgte in einem Kühllabor bei 4°C . Das Blattmaterial wurde grob zerkleinert, in einem ‚Waring Blendor‘ dreimal für 3 Sek. auf kleinster Stufe und dreimal für 3 Sek. auf höchster Stufe mit halbgefrorenem Isolierungsmedium homogenisiert. Das Homogenat wurde anschließend durch 4 Lagen Miracloth (Calbiochem, LaJolla, USA) filtriert und zur Sedimentierung der Chloroplasten eine Minute bei $2000 \times g$ und 4°C zentrifugiert. Das Sediment wurde im fünffachen Volumen Waschpuffer mit einem

<u>Isolierungsmedium</u>		<u>Percoll-Gradienten-Lösungen</u>	
25 mM	HEPES/KOH pH 6,8	80 % (v/v)	Percoll
1,2 mM	MnCl ₂	330 mM	Sorbitol
0,8 mM	MgCl ₂	50 mM	HEPES/KOH pH 8
330 mM	Sorbitol		
4 mM	Natriumascorbat	40 % (v/v)	Percoll
4 mM	DTT	330 mM	Sorbitol
1 mM	KH ₂ PO ₂	50 mM	HEPES/KOH pH 8
1 mM	EDTA		
25 mM	MES		
0,1 % (w/v)	PVP-10		
0,2 % (w/v)	BSA		
 <u>Waschmedium</u>			
330 mM	Sorbitol		
50 mM	HEPES/KOH pH 8,0		

Pinsel resuspendiert und die Chloroplasten erneut sedimentiert (4500 x g, 15 Sek, 4°C). Das Sediment wurde wiederum mit einem Pinsel in geringem Volumen Waschmedium resuspendiert und auf einen zweistufigen Percollgradienten (80% und 40% Percoll) geschichtet. Bei einer Zentrifugation (5000 x g, 20 Min., 4°C) sammeln sich die intakten Chloroplasten auf dem 80%-Percollkissen. Die intakten Chloroplasten wurden vorsichtig abgenommen, mit mindestens 2 Vol. Waschmedium versetzt und bei 4000 x g für 5 Min. bei 4°C sedimentiert. Anschließend wurden die Chloroplasten in wenig Waschmedium resuspendiert und quantifiziert (2.5.2).

2.5.2 Mikroskopische Quantifizierung von Chloroplasten

Die Reinheit, Intaktheit und Zahl der Plastiden in einer Suspension kann mikroskopisch unter Verwendung einer Thoma-Zählkammer bestimmt werden. Die aus 2.5.1 stammende Chloroplastensuspension wurde 1:100 bis 1:400 verdünnt, um einzelne Chloroplasten unter dem Mikroskop auflösen zu können. Nicht mehr intakte Chloroplasten erscheinen im Phasenkontrast dunkel, während Chloroplasten mit intakten Hüllmembranen hell auf-

leuchten. Die Zahl der Plastiden ermittelt sich aus der Zahl intakter Chloroplasten in einem Großquadrat der Zählkammer, dem Verdünnungsfaktor und dem Kammervolumen. Zur statistischen Absicherung wurden in der Regel 8 Großquadrate ausgezählt, die Werte gemittelt und die Zahl der Chloroplasten nach folgender Formel berechnet.

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

2.5.3 Isolierung von Amyloplasten

Extraktionspuffer

20 mM	HEPES/KOH pH 8,0
1 mM	MgCl ₂
500 mM	Sorbitol
5 mM	DTT
5 mM	KCl
1 mM	EDTA
10 % (w/v)	Ethylen-Glycol
1 % (w/v)	PVP-40
0,1 % (w/v)	BSA

Gradientenpuffer

Nycodenz 2 % (w/v) (Sigma)
in Extraktionspuffer

Die Isolierung von intakten Amyloplasten erfolgte nach einer modifizierten Methode von WISCHMANN *et al.* (1999). Zunächst wurde ein 5 ml Agar-Agar-Kissen (1% (w/v)) in einem 50 ml Reaktionsgefäß (Sarstedt, Nümbrecht) vorgelegt, das nach dem Aushärten mit 5 ml Gradientenpuffer überschichtet und auf Eis gekühlt wurde. Anschließend wurden 10 - 15 Kartoffelknollen mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 0,5 - 2 cm mit einer Rasierklinge in 35 ml eisgekühltem Extraktionspuffer zu kleinen Würfeln von ca. 1 mm Kantenlänge zerkleinert. Die Suspension wurde durch 2 Lagen Miracloth (Calbiochem, La Jolla, USA) filtriert und das Filtrat vorsichtig auf den Gradienten geschichtet. Bei einer Zentrifugation (30 x g, 4°C, 30 Min.) wurden intakte und zerstörte Amyloplasten auf dem Agar-Agar-Kissen sedimentiert. Anschließend wurde das Sediment in 2 ml Extraktionspuffer vorsichtig resuspendiert und die Anzahl intakter Amyloplasten bestimmt (2.5.4).

2.5.4 Quantifizierung von Amyloplasten

4 x Reaktionspuffer

1 M	MOPS/KOH pH 8	20 mM	NADP
20 mM	ADP-Glucose	100 mM	3-PGA
120 mM	EGTA	1 M	MgCl ₂
2 U	Phosphoglucomutase	2 U	Glucose-6-Phosphat-dehydrogenase

Die Überprüfung der physiologischen Integrität und die Unterscheidung von intakten Amyloplasten und Stärkekörnern ohne Membran gestaltet sich am Mikroskop äußerst schwierig, da die Membranen lichtmikroskopisch nicht auflösen sind. Daher wurde zum Test der Amyloplastenfraction und zur Quantifizierung der Amyloplasten ein biochemischer Ansatz verwendet.

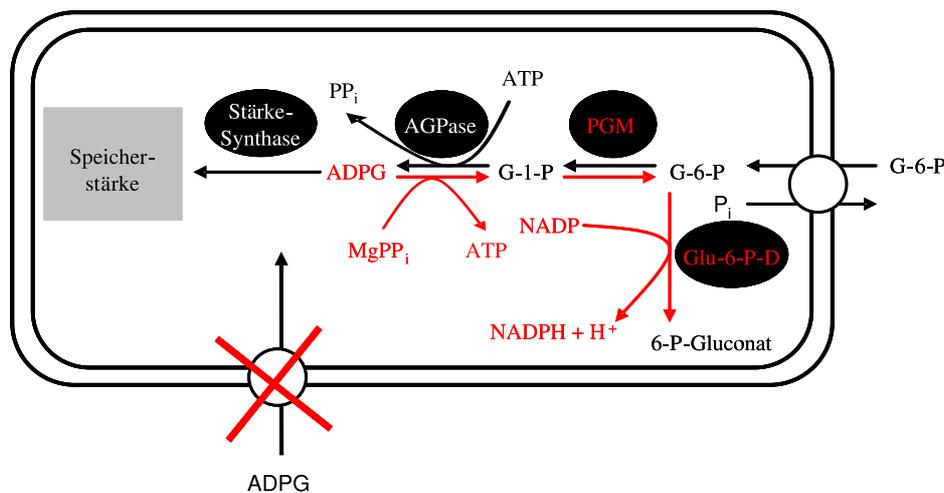


Abb. 4: Schematische Darstellung des Prinzips der Aktivitätsmessung der ADP-Glucose-Pyrophosphorylase. Die schwarzen Pfeile kennzeichnen die *in vivo* ablaufenden Reaktionen, die roten Pfeile die Reaktionen nach Zugabe der in rot dargestellten Substrate und Enzyme. Alle Enzyme sind mit schwarzen Kreisen hinterlegt. ADPG = Adenosindiphosphat-Glucose, AGPase = ADP-Glucose-Pyrophosphorylase, G-1-P = Glukose-1-Phosphat, G-6-P = Glukose-6-Phosphat, Glu-6-P-D = Guucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, PGM = Phosphoglucomutase

Dieser Ansatz basiert auf einer Aktivitätsmessung der ADP-Glucose-Pyrophosphorylase (AGPase), die die Reaktion von Glucose-1-Phosphat zu ADP-Glucose katalysiert (Abb. 4). Durch die Zugabe von ADP-Glucose im Überschuß wird das Reaktionsgleichgewicht zum Edukt verschoben. Glucose-1-Phosphat wird anschließend durch die Phosphoglucomutase in Glucose-6-Phosphat umgewandelt, das wiederum durch die Glucose-6-Phosphatdehydrogenase in 6-Phospho-Glukonat unter Bildung von $\text{NADPH} + \text{H}^+$ umgewandelt wird. Die Bildung von $\text{NADPH} + \text{H}^+$ wird bei einer Wellenlänge von 340 nm photometrisch bestimmt. Das Substrat ADP-Glucose kann nicht über die Membranen der Amyloplasten transportiert werden. Aus einer vergleichenden Aktivitätsbestimmung zwischen einer Suspension, in der alle Amyloplasten zerstört wurden, und einer Suspension, in der sich intakte Amyloplasten befinden, errechnet sich der relative Anteil intakter Amyloplasten in der Suspension. Nach mikroskopischer Quantifizierung aller Stärkekörner in der Suspension (2.5.2) wird die absolute Zahl intakter Amyloplasten berechnet.

Die Bestimmung erfolgte, indem 100 μl der nach 2.5.3 präparierten Amyloplastensuspension kräftig durchmischt wurden, um die Amyloplasten mechanisch zu zerstören. Parallel wurden weitere 100 μl der Amyloplastensuspension vorsichtig auf Eis sedimentiert. 50 μl des jeweiligen Überstands wurden mit 125 μl Reaktionspuffer und 320 μl Wasser versetzt. Die Reaktion wurde mit 5 μl 120 mM MgPP_i gestartet und die Kinetik der Reaktion für 7 Min. bei einer Wellenlänge von 340 nm gemessen. Mit Hilfe der Formel

$$100 - \frac{\text{Aktivität in intakten Amyloplasten} \cdot 100}{\text{Aktivität in zerstörten Amyloplasten}}$$

errechnete sich der relative Anteil intakter Amyloplasten in der Suspension.

2.5.5 Isolierung von Mitochondrien

<u>Extraktionspuffer</u>		<u>10 x Gradientenpuffer</u>	
50 mM	Tris/HCl pH 7,5	0,5 M	Tris/HCl pH 7,5
0,5 M	Saccharose	50 mM	EDTA
5 mM	EDTA	1 % (w/v)	BSA
0,1 % (w/v)	BSA		
25 mM	β -Mercaptoethanol		

Die Isolierung intakter Mitochondrien aus Kartoffelknollen erfolgte nach der Methode von STAUDINGER und KEMPKEN (2003). 500 g Kartoffelknollen wurden in 500 ml Extraktionspuffer in einem 'Waring Blendor' gründlich zerkleinert und das Homogenat durch vier Lagen Miracloth (Calbiochem, La Jolla, USA) filtriert. Das Filtrat wurde anschließend bei 1000 x g und 4°C für 10 Min. zentrifugiert und der Überstand erneut durch zwei Lagen Miracloth filtriert. Die in dem Filtrat enthaltenen Mitochondrien wurden anschließend bei 12000 x g, 4°C für 20 Min. sedimentiert. Das Sediment wurde nach der Zentrifugation in 2 Vol. Puffer A mit einem Pinsel resuspendiert, auf einen Saccharosegradienten (8 ml 52 % (w/v), 10 ml 40 % (w/v), 10 ml 36 % (w/v), 4 ml 20 % in 1 x Gradientenpuffer) aufgetragen und 1,5 h bei 24000 UpM (Centrikon T-1065, Rotor TST2838) und bei 4°C zentrifugiert. Die resultierende Mitochondrien-Bande zwischen den 52 % und 40 % Saccharose-Fractionen wurde abgenommen, mit mindestens 2 Vol. Puffer A versetzt und für 15 Min. bei 10000 x g und 4°C sedimentiert. Das Sediment wurde in 1 ml Puffer A resuspendiert, mit 10 % Glycerin versetzt und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.6 Extraktion von Nukleinsäuren

2.6.1 Isolierung von DNA aus Pflanzenmaterial

DNA-Extraktionspuffer

350 mM	Sorbitol
100 mM	Tris/HCl pH 7,5
5 mM	EDTA

Lysispuffer

200 mM	Tris/HCl pH 7,5
50 mM	EDTA
2 M	NaCl
2 % (w/v)	CTAB

Präparationspuffer DNA

0,5 Vol.	Extraktionspuffer
0,5 Vol.	Lysispuffer
1 % (w/v)	N-Lauroylsarcosin
0,45 % (w/v)	Natrium bisulfit

TE - Puffer

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

Die Isolierung von Gesamt-DNA aus Tabak und Kartoffel erfolgte nach der von FULTON *et al.* (1995) beschriebenen Methode. Etwa 100 mg Pflanzenmaterial wurden in flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver gemörsert und danach sofort in 750 μl Präparationspuffer aufgenommen. Nach einer Inkubation von 2 Stunden bei 65°C wurde die Probe mit einem Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (14/1, (v/v)) versetzt, gut durchmischt und für 5 Min. bei 16000 x g zentrifugiert. Die DNA wurde aus der wässrigen Phase mit 350 μl Isopropanol gefällt und bei 16000 x g für 5 Min. sedimentiert. Das DNA - Präzipitat wurde anschließend mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 50 μl TE - Puffer aufgenommen. Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

2.6.2 Extraktion von RNA aus Blattmaterial

Das in flüssigem Stickstoff zu einem Pulver homogenisierte Blattmaterial (200 g) wurde mit 800 μl TriFastTM -Reagenz (peqLab, Erlangen) versetzt, gründlich durchmischt, nach Zugabe von weiteren 200 μl erneut durchmischt und 5 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 100 μl Chloroform zugegeben und die wässrige und organische Phase durch Zentrifugation (16000 x g, 10 Min.) getrennt. Die wässrige Phase wurde abgenommen und mit 800 μl Isopropanol versetzt. Nach 10 Min. Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Ribonukleinsäuren sedimentiert (16000 x g, 1 Min.) und anschließend mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen wurden die Nukleinsäuren in 20 μl H₂O aufgenommen.

2.6.3 Extraktion von RNA aus Knollenmaterial

Extraktionspuffer

8 M	Guanidiniumhydrochlorid
20 mM	MES
20 mM	EDTA
50 mM	β -Mercaptoethanol
pH 7,0	

Die Extraktion von RNA aus Knollenmaterial erfolgte nach einer modifizierten Methode

von LOGEMANN *et al.* (1987). Die Knollen wurden mit 4 Volumen eiskaltem Extraktionspuffer versetzt und in einem ‚Waring Blendor‘ gründlich gemixt. Bei einer anschließenden Zentrifugation wurden die Zellrückstände (8000 x g, 4°C, 10 Min.) sedimentiert. Der klare Überstand wurde mit einem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol - Gemisch im Verhältnis 25/24/1 versetzt, gut durchmischt und bis zur Phasentrennung zentrifugiert (10000 x g, 5 Min, 4°C). Aus dem wässrigen Überstand wurde die RNA durch Zugabe von 0,1 Volumen 3 M Natrium-Acetat, pH 5, und 0,8 Volumen Isopropanol während einer 30-minütigen Inkubation bei -80°C gefällt. Die RNA wurde nach der Inkubation bei 10000 x g und 4°C für 30 Min. sedimentiert. Anschließend wurde das Sediment zweimal mit 3 M Natrium-Acetat pH 5 gewaschen (10000 x g, RT, 5 Min), danach mindestens zweimal mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen (10000 x g, 4°C, 5 Min.) und nach dem Trocknen in 200 µl H₂O aufgenommen. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch und die Qualität der RNA wurde gelelektrophoretisch überprüft (2.4.9).

2.6.4 Phenol-Extraktion von RNA aus isolierten Organellen

Die isolierten Organellen wurden durch Aufnahme in 100 - 200 µl H₂O osmotisch abgeschlossen und anschließend mit einem Volumen Phenol versetzt, gründlich gemischt und bis zur Phasentrennung zentrifugiert (10000 x g, 4°C, 5 Min.). Die wäßrige Phase wurde abgenommen und mit einem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol im Verhältnis 25/24/1 versetzt, erneut gründlich durchmischt und bis zur Phasentrennung zentrifugiert. Danach wurde die wäßrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit Chloroform/Isoamylalkohol im Verhältnis 24/1 versetzt, vermischt und bis zur Phasentrennung zentrifugiert. Aus dem wässrigen Überstand wurde anschließend die RNA durch Zugabe von 0,1 Volumen Natrium-Acetat pH 5 und 0,8 Volumen Isopropanol bei einer 30-minütigen Inkubation bei -80°C gefällt. Die RNA wurde nach der Inkubation sedimentiert (10000 x g, 4°C, 30 Min.) und mindestens zweimal mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen (10000 x g, 4°C, 5 Min.) und nach dem Trocknen in 20 µl H₂O aufgenommen. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch, und die Qualität der RNA wurde gelelektrophoretisch bestimmt (2.4.9).

2.7 Kapillartransfer und Hybridisierung von Nukleinsäuren

2.7.1 Kapillartransfer von Nukleinsäuren auf Membranen

Nukleinsäuren wurden aus Agarosegelen durch Kapillartransfer auf positiv geladene Nylonmembranen (HybondTM-N⁺, Amersham Biosciences, Freiburg) übertragen (SAMBROOK *et al.*, 1989). Als Transferpuffer diente 10 x SSC. Der Transfer der Nukleinsäuren wurde nach der Fixierung auf der Membran (2 Std. 80°C) durch eine Methylenblau-Färbung überprüft. Hierbei wurden die Membranen zunächst 10 Min. in 5% (v/v) Essigsäure äquilibriert und anschließend 15 Min. in Färbelösung (0,004% Methylenblau, 0,5 M Natriumacetat) inkubiert. Nach mehrmaligem Spülen der Membran mit Wasser wurde der Transfer der Nukleinsäuren dokumentiert.

2.7.2 Herstellung von 'Dot-Blot'-Filtern

Klonierte DNA - Fragmente, die für einzelne Plastidengene spezifisch sind, wurden mit Hilfe einer 'Dot - Blot' - Apparatur (Schleicher und Schüll, Dassel) unter alkalischen Bedingungen (200 mM NaOH, 5 mM EDTA) auf eine Nylonmembran (HybondTM-N⁺, Amersham Biosciences, Freiburg) aufgetragen. Jedes Plasmid wurde dabei in vier Verdünnungen (328 fmol, 82 fmol, 20,5 fmol und 5,125 fmol) aufgetragen. Anschließend wurde die Membran zur Fixierung der DNA zwei Stunden bei 80°C inkubiert.

2.7.3 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden für die Hybridisierung

Die Markierung von restringierten und mit Hilfe des NucleoTrap-Kit[®] der Firma Machery-Nagel (Düren) aus einem Agarosegel eluierten DNA-Fragmente erfolgte durch Einbau von α -³²P-dCTP. Die Markierung wurde mit dem HexaLabelTM DNA Labeling Kit (MBI Fermentas) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Abtrennung freier Nukleotide erfolgte durch eine Gelfiltration mit MicroSpinTM Columns (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers.

2.7.4 Hybridisierung von DNA-Membranen

<u>20 x SSPE</u>		<u>100 x Denhardt's Lösung</u>	
200 mM	NaH ₂ PO ₄ /NaOH pH 7,4	2% (w/v)	BSA
3 M	NaCl	2% (w/v)	Ficoll
20 mM	EDTA	2% (w/v)	Polyvinylpyrrolidon

Hybridisierungslösung

5 x	SSPE
5 x	Denhardt's Lösung
0,5% (w/v)	SDS
100 µg	denaturierte Heringssperm-DNA
	/ ml Hybridisierungslösung

Die Hybridisierung von Membranen auf denen DNA immobilisiert wurde, erfolgte nach Angaben des Handbuches für 'HybondTM-N⁺-Nylonmembranen' (Amersham Biosciences, Freiburg). Die in dem Protokoll angegebene 20 x SSC-Lösung wurde durch 20 x SSPE ersetzt. Nach einer Prähybridisierung der Membran in Hybridisierungslösung bei 63°C für 2 - 3 h wurde die markierte Sonde (2.7.3, 2.9.1, 2.10.1) denaturiert (10 Min., 100°C) und der Hybridisierungslösung zugegeben. Die Hybridisierung der Membran erfolgte über Nacht bei 63°C. Die Entfernung unspezifisch gebundener Sonde erfolgte durch zehnmütiges Waschen der Membranen in 2 x SSPE / 0,1% SDS (w/v) bei RT und anschließendem Waschen mit schrittweise verdünnten SSPE-Lösungen (2 x SSPE, 1 x SSPE, 0,5 SSPE, 0,2 x SSPE) denen je 0,1% SDS (w/v) zugesetzt wurde. Jeder Waschschrift erfolgte bei 63 °C für jeweils mindestens 15 Min. Die Detektion der Hybridisierungssignale erfolgte wie in 2.7.7 beschrieben.

2.7.5 Hybridisierung von RNA-Membranen

Die Hybridisierung von Membranen, auf denen RNA immobilisiert wurde, erfolgte in Dextransulfatpuffer bei 65°C wie in KLEBER-JANKE und KRUPINSKA (1997) beschrieben. Nach einer Prähybridisierung von 2 - 3 h in Dextransulfatpuffer wurden der Hybridisie-

<u>Dextransulfatpuffer</u>	<u>20 x SSC</u>
5% (w/v) Dextransulfat	300 mM tri-Natriumcitrat pH 7,0
1% (w/v) SDS	3 M NaCl
0,75 M NaCl	
100 µg denaturierte Heringssperm-DNA / ml Hybridisierungslösung	

lungslösung 500.000 cpm / ml Hybridisierungslösung denaturierte Sonde (100°C, 10 Min., 2.7.3) zugegeben und die Membran über Nacht bei 65°C hybridisiert. Nach der Hybridisierung wurden die Membranen für 10 Min. in 2 x SSC, 0,1% SDS (w/v) bei Raumtemperatur und anschließend jeweils 10 Min. in 2 x SSC, 1 x SSC, 0,5 x SSC, 0,2 x SSC mit je 0,1% SDS bei 65°C gewaschen. Die Detektion der Hybridisierungssignale erfolgte wie in 2.7.7 beschrieben.

2.7.6 Mehrfachverwendung von Membranen

Die auf der Membran gebundenen Sonden konnten in Anlehnung an die Angaben des Membranherstellers (Amersham Biosciences, Freiburg) durch einen zweifachen Waschschrift mit 0,2 % kochendem SDS (w/v) entfernt werden. Die Membranen konnten anschließend erneut für Hybridisierungen verwendet werden.

2.7.7 Detektion von Hybridisierungssignalen

Die Membranen wurden nach der Hybridisierung in einer Autoradiographiekassette auf einer ‚Imaging Plate‘ (BAS-MS 2025, Fuji) über Nacht exponiert. Nach der Exposition wurden die Autoradiogramme der ‚Imaging Plate‘ mit Hilfe eines Fla-5000 BioImager (Fuji) digitalisiert. Zusätzlich wurden die Membranen in einer Autoradiographiekassette mit ein bis zwei Verstärkerfolien (Trimax Regular 16, Imation, Rochester, NY, USA) bei -80°C auf Röntgenfilm (Hyperfilm MP, Amersham Biosciences, Freiburg) exponiert. Die Entwicklung der Röntgenfilme erfolgte mit der Entwicklerlösung Roenteroll HC (Tetenal, Norderstedt) und der Fixierlösung MRP Superfix Plus (Tetenal, Norderstedt) nach Angaben des Herstellers.

2.8 Extraktion und Analyse von Proteinen

2.8.1 Extraktion von Proteinen aus Blättern und Chloroplasten

Zur Isolierung von Proteinen aus Chloroplasten fanden nach 2.5.1 präparierte Chloroplasten Einsatz. Für die Isolierung von Gesamtproteinextrakten aus Blättern wurden unter flüssigem Stickstoff zu feinem Pulver gemahlene Blätter verwendet.

Die Proteine wurden durch eine 10 minütige Inkubation der Probe in 1 x PSB (2.8.4) extrahiert. Nach kurzem Abkühlen der Proben auf Eis wurden unlösliche Bestandteile durch Filtration durch Miracloth (Calbiochem, La Jolla, USA) und anschließende Zentrifugation abgetrennt. Die Bestimmung der Proteinkonzentration des Lysates erfolgte nach BRADFORD (1976) (2.8.3).

2.8.2 Extraktion von Proteinen aus Knollen und Amyloplasten

Die Extraktion von Proteinen aus isolierten Amyloplasten (2.5.3) erfolgte durch Zugabe von 1 Vol. Phenol zur Probe und anschließendem Schütteln für 10 Min. bei RT. Nach einer Zentrifugation zur Phasentrennung (16000 x g, 10 Min., 4°C) wurde die wässrige Phase verworfen und die organische inklusive der Interphase mit 2 Volumen Ethanol versetzt und danach 30 Min. auf Eis inkubiert. Bei der anschließenden Zentrifugation (16000 x g, 45 Min., 4°C) sedimentierten die ausgefallenen Proteine und wurden anschließend 2 x mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen und luftgetrocknet. Die getrockneten Sedimente wurden in 0,2 M NaOH, 0,1% (w/v) SDS aufgenommen und die Konzentration der Proteine unter Verwendung der Methode von BRADFORD (1976) (2.8.3) bestimmt.

2.8.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinmenge in einer Probe erfolgte nach der von BRADFORD (1976) beschriebenen Methode. 1 - 10 μ l der Probe wurden mit Wasser auf 800 μ l aufgefüllt und mit 200 μ l Bradford-Reagenz (BioRad, München) versetzt. Nach mindestens 15 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen (UV-2501PC, Shimadzu, Hannover). Als Referenz diente eine Eichreihe aus BSA.

2.8.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese von Proteinen

5 x PSB (Protein Sample Buffer)

250 mM	Tris/HCl pH 6,8
50 % (v/v)	Glyzerin
10 % (w/v)	SDS
50 mM	DTT
0,1 % (w/v)	Bromphenolblau

Die Auftrennung von Proteingemischen erfolgte in Polyacrylamid-Gelen nach LAEMMLI (1970). Zunächst wurden die Proben in einem Sammelgel (5 % SDS, pH 6,8) fokussiert und in einem Trenngel (pH 8,8) aufgrund ihrer Molekulargewichte getrennt. Je nach Zielsetzung der Gelelektrophorese wurden Acrylamidkonzentrationen von 7,5 % (Auftrennung größerer Proteine) bis 14 % (Auftrennung kleiner Proteine) verwendet.

Die Proben wurden vor dem Auftragen mit 0,2 Volumen fünffach konzentriertem Auftragspuffer (5 x PSB) versetzt und 5 Min. bei 95°C denaturiert. Die Auftrennung erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 25 mA bei Raumtemperatur in Minigelen (Biometra, Göttingen) einer Größe von 80 x 85 x 1 mm.

2.8.5 Färbung von Proteingelen

Die in Polyacrylamid-Gelen aufgetrennten Proteine wurden mit Coomassie-Brilliantblau R250 gefärbt. Hierzu wurden die Gele nach der Elektrophorese 30-90 Min. in Färbelösung (0,025 (w/v) Coomassie Brilliantblau R250 in 10% (v/v) Essigsäure) inkubiert. Der Hintergrund wurde durch mehrstündige Inkubation in 10% (v/v) Essigsäure entfärbt.

2.8.6 Trocknung von Proteingelen

Zur längerfristigen Aufbewahrung wurden die Polyacrylamid-Gele getrocknet. Hierzu wurden die Gele zunächst 2 h in Fixierlösung (10 % (v/v) Essigsäure, 40 % (v/v) Methanol) inkubiert. Das Gel wurde anschließend luftblasenfrei zwischen zwei Lagen Einmachfolie

(DETI GmbH, Meckesheim) eingeschlagen. Mit Hilfe von Klammern wurden die verschiedenen Lagen auf eine Glasplatte fixiert und bei Raumtemperatur getrocknet.

2.8.7 Elektrotransfer von Proteinen auf Membranen ‘Western-Blot‘

<u>Kathodenpuffer</u>		<u>Anodenpuffer</u>	
20 mM	Tris	20 mM	Tris
150 mM	Glycin	150 mM	Glycin
0,1 % (w/v)	SDS	30 % (v/v)	Methanol

Nach der Auftrennung von Proteinen in Polyacrylamidgelen wurden diese zur immunologischen Analyse auf Nitrocellulosemembranen (Schleicher & Schuell, Dassel) transferiert. Das Gel wurde nach der Elektrophorese 10 Min. in Kathodenpuffer äquilibriert, während die Nitrocellulosemembran ca 10 Min. in Anodenpuffer inkubiert wurde. Der Transfer erfolgte in einer Elektro-Blot-Apparatur (‘Fastblot‘, Biometra, Göttingen) für 1,5 - 2,5 Std. bei 4°C und einer Stromstärke von 0,65 mA/cm². Zur Überprüfung des Transfers wurden die auf der Membran immobilisierten Proteine mit Ponceau-Lösung (0,02% Ponceau S, 3% (w/v) TCA) bei einer 10 minütigen Inkubation und anschließendem Waschen der Membranen in H₂O angefärbt.

2.8.8 Immunologischer Nachweis von Proteinen

10 x TBST

100 mM	Tris pH 8
1 M	Natriumchlorid
0,5 % (v/v)	Tween 20

Der Nachweis von Proteinen mit Hilfe spezifischer Antikörper erfolgte nach der von HUMBEC *et al.* (1994) beschriebenen Methode. Die Membran mit den immobilisierten Proteinen (2.8.7) wurde zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit 4 % (w/v) Milch-

pulver in 1 x TBST für 1 Std. inkubiert. Nach dem Waschen der Membran in 1 x TBST (2 x 5 Sek., 2 x 5 Min., 1 x 15 Min.) erfolgte eine einstündige Inkubation mit dem proteinspezifischen Antikörper. Anschließend wurde die Membran erneut wie oben beschrieben gewaschen. Der Nachweis des primären Antikörpers erfolgte durch eine 45minütige Inkubation mit dem sekundären Antikörper, der den ersten Antikörper spezifisch erkennt. Im Falle der ECL - Detektion ('enhanced chemiluminescence') ist an den sekundären Antikörper eine Meerrettichperoxidase (Amersham Biosciences, Freiburg) gekoppelt. Der Protein - Antikörper - Komplex kann durch Zugabe von Luminol und Wasserstoffperoxid nachgewiesen werden. Die Entwicklung der Filme (Hyperfilm ECL, Amersham Biosciences) erfolgte wie in 2.7.7 beschrieben.

2.9 Analyse der Transkription in Plastiden

2.9.1 ‚Run-on‘-Transkription

<u>2 x Transkriptionspuffer</u>		<u>Stopp-Puffer</u>	
100 mM	HEPES/KOH pH 8,0	50 mM	Tris/HCl pH 8,0
20 mM	MgCl ₂	25 mM	EDTA
50 mM	K-Acetat	5% (w/v)	Na-Sarkosinat
20 mM	DTT		
je 250 mM	ATP, GTP, UTP		
1 mg/ml	Heparin		

Die ‚Run on‘-Transkriptionsanalyse ermöglicht sowohl die Bestimmung der Transkriptionsaktivität des plastidären Transkriptionsapparates als auch die relative Transkriptionsrate einzelner Gene. Die Analyse der Transkription erfolgte wie beschrieben (KLEIN und MULLET, 1990; KRUPINSKA, 1992; KRAUSE *et al.*, 1998). Die ‚Run on‘-Transkriptionsanalysen mit Amyloplasten verliefen analog zu den Analysen mit Chloroplasten mit der Modifikation, daß bei einem Ansatz mit Amyloplasten alle Volumina verdoppelt wurden. Ein Standard-Ansatz mit Chloroplasten enthielt 1 x 10⁷ Plastiden, 50 µl 2 x Transkriptionspuffer, 40 µl Wasser und 10 µl α-³²P-CTP. Die Reaktion wurde durch Zugabe des auf 25°C

vorgewärmten Reaktionsgemischs zu den Plastiden gestartet und erfolgte innerhalb von 6 Min. bei 25°C. Durch Zugabe von 20 µl Stopp-Puffer wurde die Transkription gestoppt, die markierte RNA wie in 2.6.4 isoliert und anschließend hybridisiert (s. 2.7.4).

2.9.2 ‚Primer-Extension‘-Analyse

Probenpuffer

95 % (v/v)	Formamid
0,5 mM	EDTA
0,025 % (w/v)	SDS
0,025 % (w/v)	Bromphenolblau

Mit Hilfe der ‚Primer - Extension‘ - Analyse kann der Transkriptionsstart einzelner Transkripte ermittelt werden. Hierbei wird mit einem spezifischen, markierten Oligonukleotid eine cDNA - Synthese und parallel eine Sequenz - Reaktion durchgeführt. Nach einer gelelektrophoretischen Auftrennung der Produkte können die spezifischen Enden des prozessierten und nicht prozessierten Produkts anhand der DNA - Sequenz bestimmt werden. Die Sequenzreaktion erfolgte wie in 2.4.7 beschrieben. Die cDNA - Synthese wurde mit 10 - 30 µg RNA und 10 pmol IRD - 800 markierten Oligonukleotid (MWG-Biotech, Ebersberg) in einem Gesamtvolumen von 20 µl durchgeführt. Der Reaktionsansatz wurde zunächst 5 Min. bei 95°C denaturiert, auf Eis abgekühlt und nach Zugabe von 200 Units SuperScript IITM Reverse Transcriptase (Invitrogen, Karlsruhe) und 5 mM dNTP für 1 Stunde bei 50°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch 10 minütiges Erhitzen auf 72°C gestoppt, auf Eis abgekühlt und die im Reaktionsansatz vorhandene RNA durch Zugabe von 2 Units RNaseH und eine anschließende 30 minütige Inkubation bei 37°C verdaut. Es folgte die Präzipitation der ‚Primer - Extension‘ - Produkte wie in 2.4.8 beschrieben. Das Präzipitat wurde in 5 µl Probenpuffer resuspendiert und 1,5 µl des Ansatzes mit den Sequenzreaktionen auf ein Sequenzgel aufgetragen (2.4.7).

2.10 Analyse der RNA-Zusammensetzung in Plastiden

2.10.1 3'-Markierung von RNA

Die Markierung von RNA durch Ligation mit dem Nukleotid 3'-5'- α -Bisphosphat-CTP erfolgte nach Angaben des Herstellers (MBI, Fermentas). 20 μg RNA wurden mit 1 mM ATP, 0,5 μg BSA, 10 Units RNA Ligase und 2 μl 10 x Reaktions-Puffer in einem Gesamtvolumen von 20 μl für 2 h bei 37°C inkubiert. Im Anschluß an die Inkubation wurde der Reaktionsansatz mit Wasser auf 100 μl Gesamtvolumen aufgefüllt und mit 100 μl Phenol, Chloroform, Isoamylalkohol (25/24/1) versetzt, kräftig geschüttelt und bis zur Phasentrennung zentrifugiert (16000 x g, 5 Min.). Die wässrige Phase wurde vorsichtig abgenommen, mit 0,8 Vol. Isopropanol und 1/10 Vol. 3 M Natrium-Acetat pH 5 versetzt, gut durchmischt und mindestens 30 Min. bei -80°C inkubiert. Die gefällten Nukleinsäuren wurden anschließend mittels Zentrifugation (16000 x g, 10 Min.) sedimentiert, mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen und wie in 2.7.4 hybridisiert.

2.11 Analyse der Translation in Plastiden

2.11.1 Isolierung von polysomaler RNA

Polysomenpuffer

200 mM	Tris/HCl pH 9,0
35 mM	MgCl ₂
200 mM	KCl
25 mM	EGTA
200 mM	Saccharose
1% (v/v)	Triton X-100
2% (v/v)	Polyoxyethylen-10-tridecyl ether
0,5 mg/ml	Heparin
100 mM	β -Mercaptoethanol
sterilfiltrieren	

<u>10 x Gradienten-Puffer</u>		<u>10 x Kontroll-Puffer</u>	
400 mM	Tris/HCl pH 8,0	400 mM	Tris/HCl pH 8,0
200 mM	KCl	200 mM	KCl
100 mM	MgCl ₂	10 mM	EDTA
50 µg/ml	Heparin	50 µg/ml	Heparin
250 µg/ml	Cycloheximid	250 µg/ml	Cycloheximid
1 mg/ml	Chloramphenicol	1 mg/ml	Chloramphenicol

Die Isolierung polysomaler RNA erfolgte nach der Methode von BARKAN (1993). Bei dieser Methode werden die Ribosomen-RNA-Komplexe aufgrund ihrer Dichte in einem Saccharosegradienten und somit entsprechend der Assoziation von Ribosomen mit den entsprechenden mRNAs voneinander getrennt. Anschließend wird der Gradient fraktioniert, und die in den entsprechenden Fraktionen enthaltene RNA-Zusammensetzung kann analysiert werden. Als Kontrolle dient ein Saccharosegradient, der mit EDTA versetzt wurde. In diesem Fall dissoziieren die Ribosomen aufgrund von MgCl₂-Mangels und können daher nicht sedimentieren.

Die isolierten und sedimentierten Plastiden (2.5.1, 2.5.3) wurden direkt nach der Isolierung in 1,5 ml Polysomenpuffer aufgenommen und 10 Min. auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation wurden unlösliche Plastidenbestandteile bei 16000 x g und 4°C für 5 Min. sedimentiert. Der Überstand wurde mit 10 % (v/v) Natrium-Deoxycholat auf eine Endkonzentration von 0,5 % (v/v) eingestellt und anschließend 5 Min. auf Eis inkubiert. Danach wurde das Gemisch 15 Min. bei 16000 x g und 4°C zentrifugiert und der Überstand auf einen Saccharosedichtegradienten (je 2 ml 55% (w/v), 40% (w/v), 30% (w/v) und 15% (w/v) Saccharose in 1 x Gradienten-Puffer) geladen. Vor der Beladung des Kontrollgradienten wurde zudem die Kontrolle, in der dissoziierte Ribosomen vorliegen, auf 20 mM EDTA eingestellt. Nach einer 3,5stündigen Zentrifugation der mit der Probe beladenen Saccharosedichtegradienten bei 24000 UpM bei 4° (Rotor TST 2838, Centrikon T-1065) wurden diese zu je einem 1 ml fraktioniert. Jede Fraktion wurde mit einem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25/24/1) versetzt, gut durchmischt und bis zur Phasentrennung zentrifugiert (16000 x g, 4°C, 5 Min.). Die wässrige Phase wurde anschließend mit 0,1 Volumen Natrium-Acetat pH

5 und 0,8 Vol. Isopropanol versetzt und für 30 Min. bei -80°C inkubiert. Die präzipitierten Nucleinsäuren wurden daraufhin bei $16000 \times g$, 4°C für 10 Min. sedimentiert. Das Sediment wurde mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in $10 \mu\text{l H}_2\text{O}$ gelöst. Die isolierten polysomalen RNAs wurden bis zur weiteren Analyse bei -80°C gelagert.

2.12 Transmissionselektronenmikroskopie

Fixierlösung nach KARNOVSKY (1965)

0,2 % (v/v)	Formaldehyd
1,25 % (v/v)	Glutaraldehyd
120 mM	Na-Cacodylat pH 7,2
54 mM	CaCl_2

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Maria Mulisch in der Zentralen Mikroskopie der CAU Kiel erstellt. Zunächst wurden die im Dunkeln geernteten Proben für 10 Min. bei 80 mbar in einem 8 % (v/v) Methanol/Leitungswasser-Gemisch evakuiert. Anschließend wurden die Proben über Nacht bei 4°C in Fixierlösung inkubiert, in 0,1 M Na-Cacodylat (pH 7,2) gewaschen und anschließend 1 Std. in 1 % OsO_4 (w/v) bei Raumtemperatur fixiert. Nach der Fixierung wurden die Proben erneut in 0,1 M Na-Cacodylat (pH 7,2) gewaschen, über eine aufsteigende Ethanolreihe (je 2×10 Min. in 50 %, 70 %, 90 % (v/v) Ethanol) entwässert und 4×20 Min in 100 % Ethanol getrocknet. Danach wurden die Proben über Propylenoxid (2×10 Min.) in Epon 812 (Fluka, Buchs, Schweiz) überführt und über Nacht bei 60°C polymerisiert. Von den auspolymerisierten Proben wurden mit Hilfe des Ultramikrotomes UCT der Firma Leica (Bensheim) 50 nm Ultradünnschnitte angefertigt und mit Uranylacetat (WATSON, 1958) und Bleicitrat (REYNOLDS, 1963) nachkontrastiert. Die Untersuchung der Dünnschnitte erfolgte in einem Transmissionselektronenmikroskop 208 S der Firma Philips (Kassel). Die Bildaufnahme erfolgte mit einer Mega View CCD Kamera der Firma SIS (Soft Imaging System, Münster).

2.13 Plastidentransformation

2.13.1 Plastidentransformationskonstrukte

Plastidentransformationskonstrukte enthalten in der Regel ein Selektions- und ein Zielgen, die ihrerseits mit einem Promotor, einem 5'- und einem 3'- nichttranslatierten Bereich versehen sind. Beide Gene zusammen sind für die homologe Rekombination mit einem flankierenden, zur pIDNA homologen Bereich ausgestattet. In der Arbeitsgruppe Krupinska

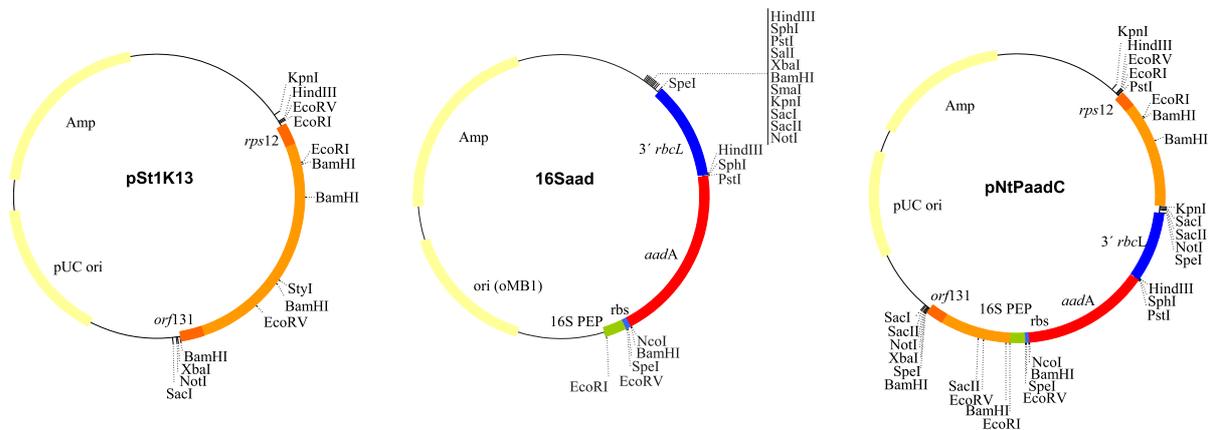


Abb. 5: Schematische Darstellung der Vektoren, die in der Arbeitsgruppe Prf. Dr. K. Krupinska zu Beginn dieser Arbeit vorlagen. pSt1K13 beinhaltet einen zur pIDNA der Kartoffel homologen Bereich (orange). 16Saad enthält den Selektionsmarker *aadA* (rot) und die zur Expression in Plastiden benötigten regulatorischen Elemente. pNtPaadC ist der Transformationsvektor mit den regulatorischen Elementen und dem Selektionsmarker aus 16Saad flankiert von den homologen Bereichen aus dem Vektor pSt1K13. 16S PEP = σ^{70} - Promotor (grün), 3'-*rbcL* = 3'-UTR des Gens für die große Untereinheit der Rubisco aus *Chlamydomonas reinhardtii* (blau), *aadA* = Gen für die Aminoglykosid 3'-Adenylyltransferase (rot), *orf131* = Gen für den offenen Leserahmen 131 (dunkelorange), *rbs* = Ribosomenbindestelle (hellblau), *rps12* = Gen für das ribosomale Protein CS12 im 'inverted repeat' (dunkelorange).

waren bereits die in Abbildung 5 dargestellten Plasmide vorhanden und sind Derivate des von KOOP *et al.* (1996) beschriebenen Transformationskonstrukt pFaadAII. pSt1K13 enthält ein 1302 bp großes PCR-Fragment aus Kartoffel-DNA, das homolog zum Bereich 100755 bis 102056 bzw. 140570 - 141871 der pIDNA ist (Acc.No. Z00044). Es stellt den intergenischen Bereich zwischen den Genen *orf131* und *rps12* dar und ist in die *SmaI* - Schnittstelle von pBSII SK- kloniert. Das Konstrukt 16Saad ist ein Derivat des von KO-

OP *et al.* (1996) beschriebenen Plastidentransformationskonstrukts pFaadAII. Es enthält den σ^{70} - Promotor des ribosomalen Operons aus Tabak, eine synthetische Ribosomenbindestelle, das Gen *aadA*, das für die Aminoglykosid 3'' - Adenyltransferase kodiert und Spectinomycinresistenz vermittelt, und den 3'- nichttranslatierten Bereich des *rbcL* - Gens aus *Chlamydomonas reinhardtii*. Zur späteren Transformation mit dem Konstrukt pSt1K23/2 wurde ein *EcoRI/SmaI* Fragment des Vektors 16Saad 'blunt end' in die *StyI* - Schnittstelle des Vektors pSt1K13 inseriert.

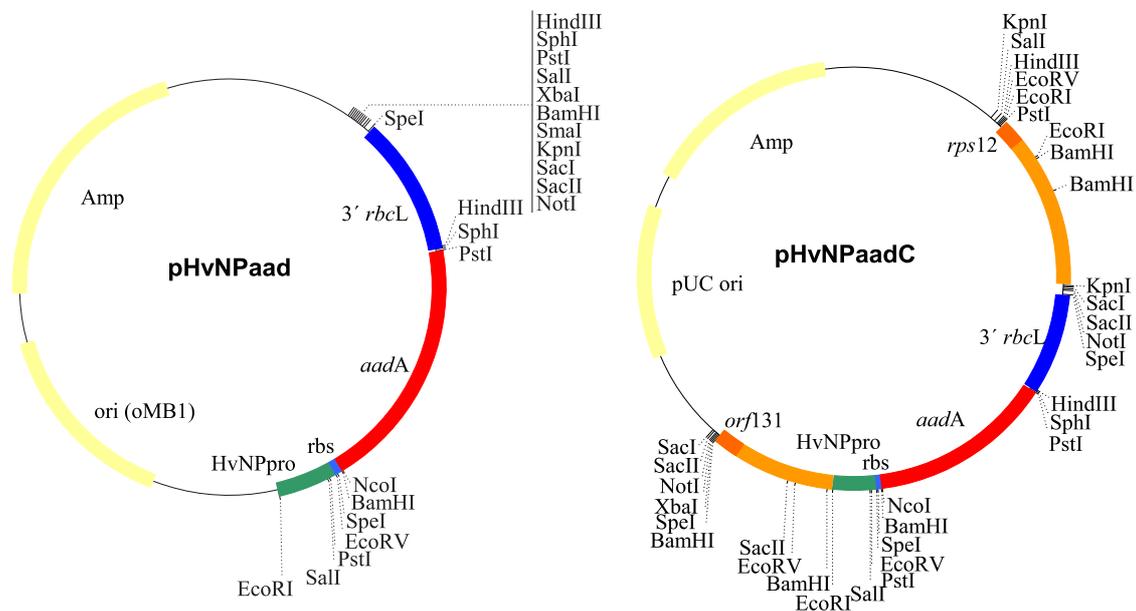


Abb. 6: Schematische Darstellung der Plastidentransformationskonstrukte mit dem ribosomalen Promotor aus Gerste. pHvNPaadC ist der Transformationsvektor mit den regulatorischen Elementen und dem Selektionsmarker aus pHvNPaad, die von den homologen Bereichen aus dem Vektor pSt1K13 (Abb. 5) flankiert werden. HvNPpro = ribosomaler Promotor aus Gerste (grün), 3'-*rbcL* = 3'-UTR des Gens für die große Untereinheit der Rubisco aus *Chlamydomonas reinhardtii* (dunkelblau), *aadA* = Gen für die Aminoglykosid 3'' - Adenyltransferase (rot), *orf131* = Gen für den offenen Leserahmen 131 (dunkelorange), *rbs* = Ribosomenbindestelle (hellblau), *rps12* = Gen für das ribosomale Protein CS12 im 'inverted repeat' (dunkelorange).

Zur vergleichenden Transformation von Plastiden wurde ein zusätzliches Konstrukt (Abb.6) hergestellt, das den ribosomalen σ^{70} - Promotor (PEP) und den ribosomalen NEP-Promotor aus Gerste enthält. Der Promotorbereich wurde mit den Oligonukleotiden PEP-NEP-EcoRI

und PEP-NEP-rev (Tab. 2) aus Gersten-pDNA amplifiziert und in die *EcoRI/EcoRV* Schnittstellen des Vektors 16Saad inseriert. Der daraus resultierende Vektor pHvNPaad wurde mit *EcoRI/SmaI* geschnitten und in die *StyI* Schnittstelle des Vektors pSt1K13 kloniert. Eine schematische Darstellung des Konstrukts pHvNPaadC ist in Abbildung 6 gezeigt.

2.13.2 Plastidentransformation von Tabak

MS-Medium

0,75 % (w/v) Agar
 0,44 % (w/v) MS-Nährsalze M0245
 3 % (w/v) Saccharose
 pH 5,8

NT-Vitamine (100 x Stock)

1 % (w/v) Myo-Inositol
 (Duchefa, I0609)
 0,01 % (w/v) Thyamin-HCl
 (Duchefa, T0614)

RMOP-Medium

0,75 % (w/v) Agar
 0,43 % (w/v) MS-Nährsalze M0221
 1 % (v/v) NT-Vitamine (100 x Stock)
 0,1 % (v/v) BAP (Stammlösung)
 0,01 % (v/v) NAA (Stammlösung)
 3 % (w/v) Saccharose

BAP (Stammlösung)

0,001 % (w/v) 6-Benzylaminopurine

NAA (Stammlösung)

0,001 % (w/v) 1-Naphtalen-Essigsäure

Das Protokoll zur biolistischen Plastidentransformation von Tabak wurde freundlicherweise von Dr. Waltraud Kofer, Institut für Zellbiologie und Zellkultur an der Ludwigs-Maximilians-Universität München, zu Verfügung gestellt. Zur Transformation von Plastiden von Kartoffel- und Tabakpflanzen fand eine ‘particle gun’ (PDS-1000 ‘He biolistic particle delivery system’) der Firma BioRad (München) Verwendung. Für die Transformation von Plastiden wurden die Proben im allgemeinen folgendermaßen vorbereitet: 2 mg 0,6 μm kolloidales Gold (Chempur, Karlsruhe) wird dreimal in Ethanol gewaschen, in 50 μl H_2O aufgenommen und mit 10 μg des zu transformierenden Konstruktes, 8,5 μl 3,6 M

CaCl₂ und 8,5 µl 60 mM Spermidin versetzt. Dieser Ansatz wird 1 Min. gut durchmischt und anschließend 20 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem einminütigen Zentrifugationsschritt bei 10000 x g wird der Überstand verworfen, das Sediment zweimal in 70 % Ethanol (v/v) gewaschen (1 Min., 10000 x g) und anschließend in 160 µl Ethanol resuspendiert. Jeweils 10 µl des Goldansatzes werden auf Folien der Makrocarrierhalter der Firma BioRad (München) gegeben und nach dem Verdunsten des Ethanols in die oberste Schiene der PDS-1000 Anlage eingesetzt. Die zu transformierenden Tabakpflanzen werden wie in 2.2 beschrieben 6-7 Wochen kultiviert. 4-5 Blätter dieser Pflanzen werden am Tag vor der Transformation in der Mitte der MS-Platten angeordnet und diese auf die unterste Schiene der PDS-1000 überführt. Die Transformation erfolgt mit einem Druck von 1100 psi. Nach der Transformation werden die Blätter zwei weitere Tage auf den MS-Platten kultiviert, danach in 1 x 1 cm große Stücke geschnitten, die anschließend auf MS-Medium mit 300 µg/ml Spectinomycin umgesetzt werden. Die sich aus dem Kallus entwickelnden Sprosse werden auf RMOP-Medium zur Wurzelbildung weiterkultiviert.

2.13.3 Plastidentransformation von Kartoffeln nach SIDOROV *et al.* (1999)

Z1-Medium

5 mg/ml	Zeatin
0,1 mg/ml	α-Naphtalensäure
0,44 % (w/v)	MS-Nährsalze M0231
2 % (w/v)	Saccharose
0,75 % (w/v)	Agar
pH 5,8	

Z1-Flüssigmedium

5 mg/ml	Zeatin
0,1 mg/ml	α-Naphtalensäure
0,44 % (w/v)	MS-Nährsalze M0231
2 % (w/v)	Saccharose
pH 5,8	

Die Vorbereitung der Goldpartikel zur biolistischen Plastidentransformation erfolgt wie in 2.13.2 beschrieben. Die Anzucht der Kartoffelpflanzen erfolgt wie in 2.2 beschrieben. Einen Tag vor der Transformation werden die 6 Wochen alten Kartoffelblätter vorsichtig mit sterilem Sandpapier verletzt und auf Z1-Medium ausgelegt. Die Schale mit den Blättern wird auf die mittlere Schiene der PDS-1000 Anlage gelegt und die Blätter bei einem Druck von 900 psi transformiert. Nach dem Beschuss werden die Blätter in Z1-Flüssigmedium

überführt, nach 2-3 Tagen in 0,5 x 0,5 cm grosse Stücke geschnitten und auf Z1-Medium, das 300 mg/ml Spectinomycin enthält, gelegt, das im 2 Wochen-Rhythmus erneuert wird.

3 Ergebnisse

3.1 Analysen zur Genexpression von Amyloplasten

Voraussetzung für die geplanten Analysen zur Genexpression in Amyloplasten ist die Isolierung von intakten Amyloplasten. Nachdem der Nachweis der physiologischen Integrität der Hüllmembran in der Amyloplastenpräparation gelang, wurden Analysen zur Transkription, RNA-Zusammensetzung und Translation in Amyloplasten durchgeführt.

3.1.1 Isolierung intakter Amyloplasten aus Kartoffelknollen

Die Isolierung und Quantifizierung von Amyloplasten erfolgte nach WISCHMANN *et al.* (1999). Hierbei wurden die Kartoffelknollen mit einer Rasierklinge im Aufschlußpuffer zerkleinert, die groben Bestandteile abfiltriert und die Amyloplasten anschließend mittels Dichtegradientenzentrifugation auf einem Agar-Agar-Kissen sedimentiert (s. 2.5.3). Bei lichtmikroskopischer Betrachtung der isolierten Amyloplasten zeigte sich allerdings, daß eine Unterscheidung zwischen intakten und zerstörten Plastiden so nicht durchführbar ist, da außer den Stärkekörnern weder Membranen noch innere Strukturen aufzulösen waren (Abb. 7). Die Überprüfung der physiologischen Integrität der isolierten Amylopla-



Abb. 7: Lichtmikroskopische Aufnahme der nach WISCHMANN *et al.* (1999) isolierten Amyloplasten bei einer 40 fachen Vergrößerung.

sten erfolgt daher durch Bestimmung der Aktivität der in den Amyloplasten lokalisierten ADP-Glucose-Pyrophosphorylase (AGPase, Abb. 4), deren Substrat Adenosindiphosphat-

Glucose die Hüllmembranen von intakten Amyloplasten nicht passieren kann.

Die AGPase adenyliert Glukose-1-Phosphat unter Verwendung von ATP zu Adenosindiphospho-Glukose und stellt diese energiereiche Zuckerverbindung der Stärkesynthese zur Verfügung, die diese Verbindung zur Synthese von Stärke weiterverwendet. Bei der Aktivitätsmessung der AGPase wird durch Zugabe von Adenosindiphospho-Glukose, ADP und $MgPP_i$ das Reaktionsgleichgewicht in die entgegengesetzte Richtung verschoben. Das entstehende Glukose-1-Phosphat wird durch das ebenfalls zugesetzte Enzym Phosphoglucomutase zu Glukose-6-Phosphat isomerisiert, welches wiederum von der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase zu 6-Phospho-Gluconat oxidiert wird. Als Reduktionsmittel bei dieser Reaktion dient das exogen zugegebene NADP, welches zu $NADPH + H^+$ reduziert wird und photometrisch bei einer Wellenlänge von 340 nm detektiert wird. Da das bei dieser Messung verwendete Substrat Adenosindiphosphat-Glukose (ADPG) nicht über die Membranen der Plastiden transportiert wird, muß die gemessene Enzymaktivität von aufgebrochenen Amyloplasten stammen. Mit Hilfe vergleichender Aktivitätsmessungen zwischen Fraktionen mit intakten Amyloplasten und solchen mit mechanisch zerstörten Amyloplasten, kann der relative Anteil intakter Amyloplasten in der Präparation ermittelt werden. Der Anteil freier AGPase in dieser Fraktion verhält sich dabei linear zum Anteil an nicht intakten Amyloplasten.

In Abbildung 8 A sind lichtmikroskopische Aufnahmen von intakten und mechanisch zerstörten Amyloplasten dargestellt. Die dazugehörigen Aktivitätsmessungen zeigt Abbildung 8 B. Das Diagramm enthält neben der eigentlichen Quantifizierung des Anteils an intakten Amyloplasten Kontrollmessungen, bei denen zum einen die Enzyme der Amyloplasten zuvor denaturiert wurden und zum anderen zur Ermittlung der Spezifität der Reaktion, ein Ansatz dem kein Substrat zugefügt wurde. Zudem wurde die Enzymaktivität mit Amyloplasten, die nach der Isolierung für 5 Min. bei 30 x g sedimentiert wurden, bestimmt. Bei Berechnung der Substratumsätze zeigte sich, daß in der Fraktion mit intakten, auf Eis sedimentierten Amyloplasten im Vergleich zu den zerstörten Amyloplasten 65 % des Substrats umgesetzt wurde. Dies läßt darauf schließen, daß 35 % der AGPase in dieser Fraktion nicht von dem Substrat erreicht werden konnte, da sie in intakten Amyloplasten vorlag. Der Substratumsatz in der Fraktion mit sedimentierten Amyloplasten entsprach 76 % des Gesamtumsatzes und zeigte, daß nach einer Zentrifugation bei geringer Beschleuni-

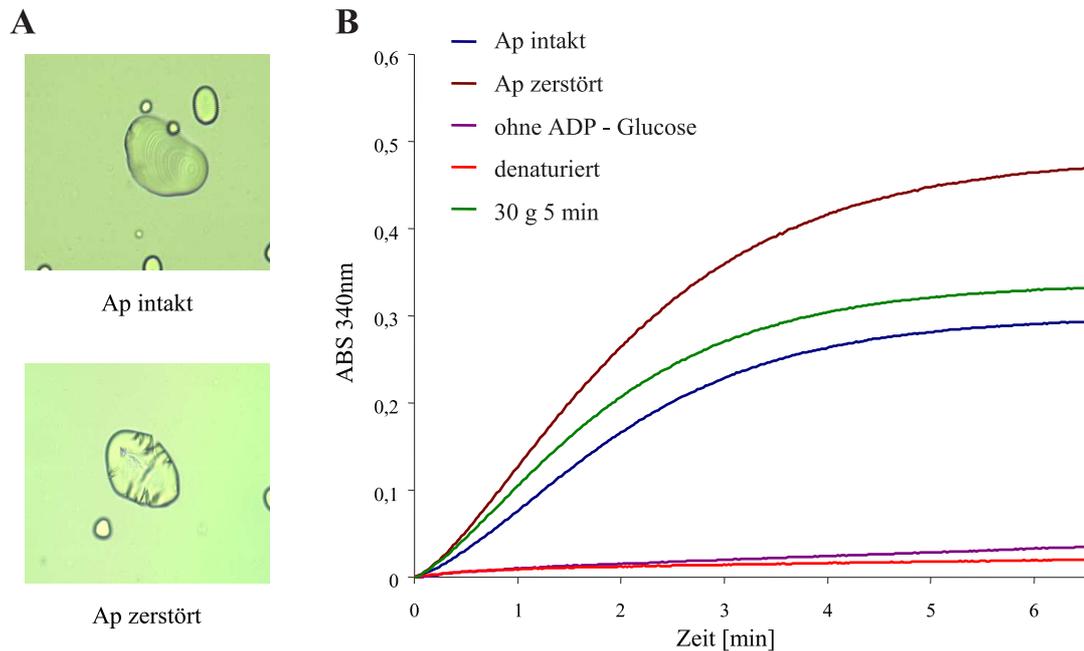


Abb. 8: Aktivitätsmessung der ADP-Glukose-Pyrophosphorylase in aufgereinigten Amyloplasten. A: Lichtmikroskopische Aufnahme von intakten und zerstörten Amyloplasten bei 100facher Vergrößerung. B: Aktivitätsmessung der AGPase in unterschiedlich behandelten Amyloplastenfractionen. Ap = Amyoplasten

gung nur noch 24 % Amyloplasten intakt waren. Dies zeigt die hohe Empfindlichkeit der Amyloplasten. Nach Messung der AGPase-Aktivität in den verschiedenen Fraktionen wurde die Zahl der Stärkekörner lichtmikroskopisch bestimmt. Die erhaltene Zahl wurde mit dem relativen Anteil intakter Amyloplasten verrechnet, um eine absolute Anzahl intakter Amyloplasten zu erhalten.

Für die geplanten Analysen zur Genexpression war es erforderlich, eine möglichst reine Fraktion an Amyloplasten ohne Kontamination durch andere Kompartimente zu erhalten. Vor allem galt es den Gehalt an Mitochondrien zu kennen.

Abbildung 9 A zeigt die Methylenblaufärbung einer Membran auf der je 10 μg Amyloplasten- und Chloroplasten-RNA neben 30 μg Gesamt-RNA aus Kartoffelknollen und 70 μg Gesamt-RNA aus Blättern fixiert wurden. Deutlich ist die unterschiedliche RNA-Zusammensetzung der Amyloplastenfraction im Vergleich zu der aus Chloroplasten isolierten RNA zu sehen.

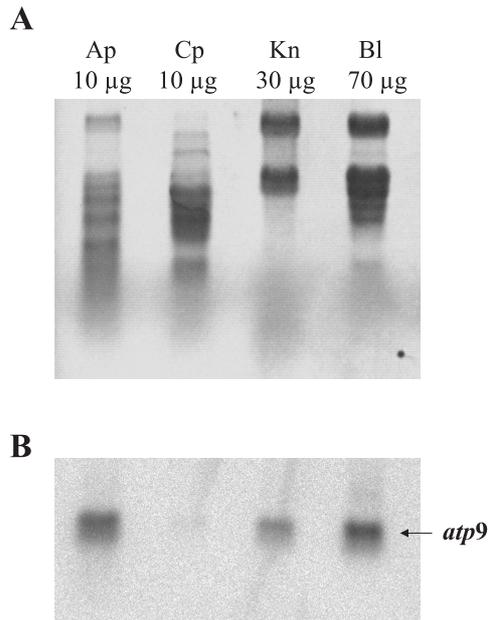


Abb. 9: Autoradiogramm der Hybridisierung einer genspezifischen Sonde für das mitochondriale Gen *atp9* mit je 10 µg RNA von Amyloplasten (Ap) und Chloroplasten (Cp) und 30 µg Gesamt - RNA aus Kartoffelknollen (Kn) und 70 µg Gesamt - RNA aus Blättern (Bl). (A) Methylenblaufärbung der Membran. (B) Autoradiogramm der Hybridisierung mit der Sonde Hvatp9.

Während in der aus Chloroplasten stammenden RNA die bereits beschriebenen typischen Banden der ribosomalen RNA zu sehen sind (REISFELD *et al.*, 1982), zeigen sich in der RNA aus der Amyloplasten-Fraktion zusätzliche Banden, die sich auf cytosolische Verunreinigungen zurückführen lassen könnten. Um eine zusätzliche Verunreinigung mit Mitochondrien zu überprüfen, wurde eine Hybridisierung mit einer Sonde, die spezifisch für das mitochondriale Gen *atp9* ist, durchgeführt. Das Autoradiogramm dieser Hybridisierung (Abb. 9 B) zeigte, daß dieses Transkript ebenfalls in der RNA aus der Amyloplasten-Fraktion vorhanden war. Versuche, die Isolierung der Amyloplasten durch Erhöhung der Zentrifugationsgeschwindigkeit zu optimieren, führten allerdings zu einem Verlust der physiologischen Integrität der Amyloplasten. Daher wurden Versuche unternommen, die an den Amyloplasten anhaftende RNA durch Exonukleasen zu entfernen, was allerdings zum Verlust der

plastidären RNAs führte. Daher wurde im weiteren Verlauf der Arbeit auf eine bessere Aufreinigung verzichtet. Eine Kontamination mit Mitochondrien von mindestens 40% war nicht zu vermeiden. Durch Verwendung plastidenspezifischer Sonden und mitochondrialer Kontrollen konnte jedoch eine ausreichende Spezifität der Analysen zur Genexpression gewährleistet werden.

3.1.2 Vergleichende Untersuchungen zur Transkription in Amyloplasten und Chloroplasten

Die pIDNA kodiert für ca. 130 Gene, deren Transkription mannigfaltigen Kontrollen unterliegt. Um den Nachweis zu führen, welche Gene in Amyloplasten der Kartoffelknolle transkribiert werden, wurden 'Run-on'-Transkriptionsanalysen durchgeführt (KLEIN und MULLET, 1990; KRUPINSKA, 1992). Bei diesem Verfahren wird den isolierten Plastiden ein radioaktiv markiertes Nukleotid angeboten, das von den RNAPs *in vitro* in *in vivo* initiierte Transkripte eingebaut wird. Da unter diesen Reaktionsbedingungen nahezu keine Transkriptionsinitiation stattfindet, repräsentieren die nach der Inkubation isolierten radioaktiv markierten Transkripte den Transkriptionsstatus der Plastiden zur Zeit der Isolierung. Durch Hybridisierung der markierten Nukleinsäuren mit genspezifischen Sonden können Aussagen über die Transkription plastidärer Gene in Amyloplasten gemacht werden.

Zur Analyse der *in vitro*-Transkripte wurden Filter verwendet, auf denen 13 Plasmide und ein PCR-Fragment immobilisiert sind, die in ihrer Gesamtheit das Plastidengenom repräsentieren (SUGIURA *et al.*, 1986). Durch Restriktion der Plasmide und des PCR-Fragments mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *BamHI* wurden Restriktionsfragmente erhalten, durch die kleine Bereiche der pIDNA voneinander zu unterscheiden waren (s. 2.3). Autoradiogramme, die nach der Hybridisierung von 'Run-on'-Transkripten aus je 1×10^7 intakten Chloroplasten und Amyloplasten aus verschiedenen großen Knollen den beschriebenen Filtern erhalten wurden (Abb. 10), zeigen, daß in Amyloplasten eine starke Reduktion der Anzahl transkribierter Gene vorliegt. Während in Chloroplasten alle Bereiche des Plastoms transkribiert werden, wird in Amyloplasten, die aus Kartoffeln mit einer durchschnittlichen Länge von 0,75 - 1,5 cm isoliert wurden, nur noch ein kleiner Teil des Plastoms transkribiert. In Amyloplasten, die aus Knollen isoliert wurden, die eine durchschnittliche Länge von 1,5 - 2 cm haben, die differentielle Transkription von Genen weiter ab. Welche Transkriptionseinheiten und Gene im einzelnen von den Amyloplasten aus kleinen und großen Knollen transkribiert werden, soll im folgenden durch eine genaue Analyse der Subfragmente der Plastidengenomklone (SUGIURA *et al.*, 1986) aufgeschlüsselt werden.

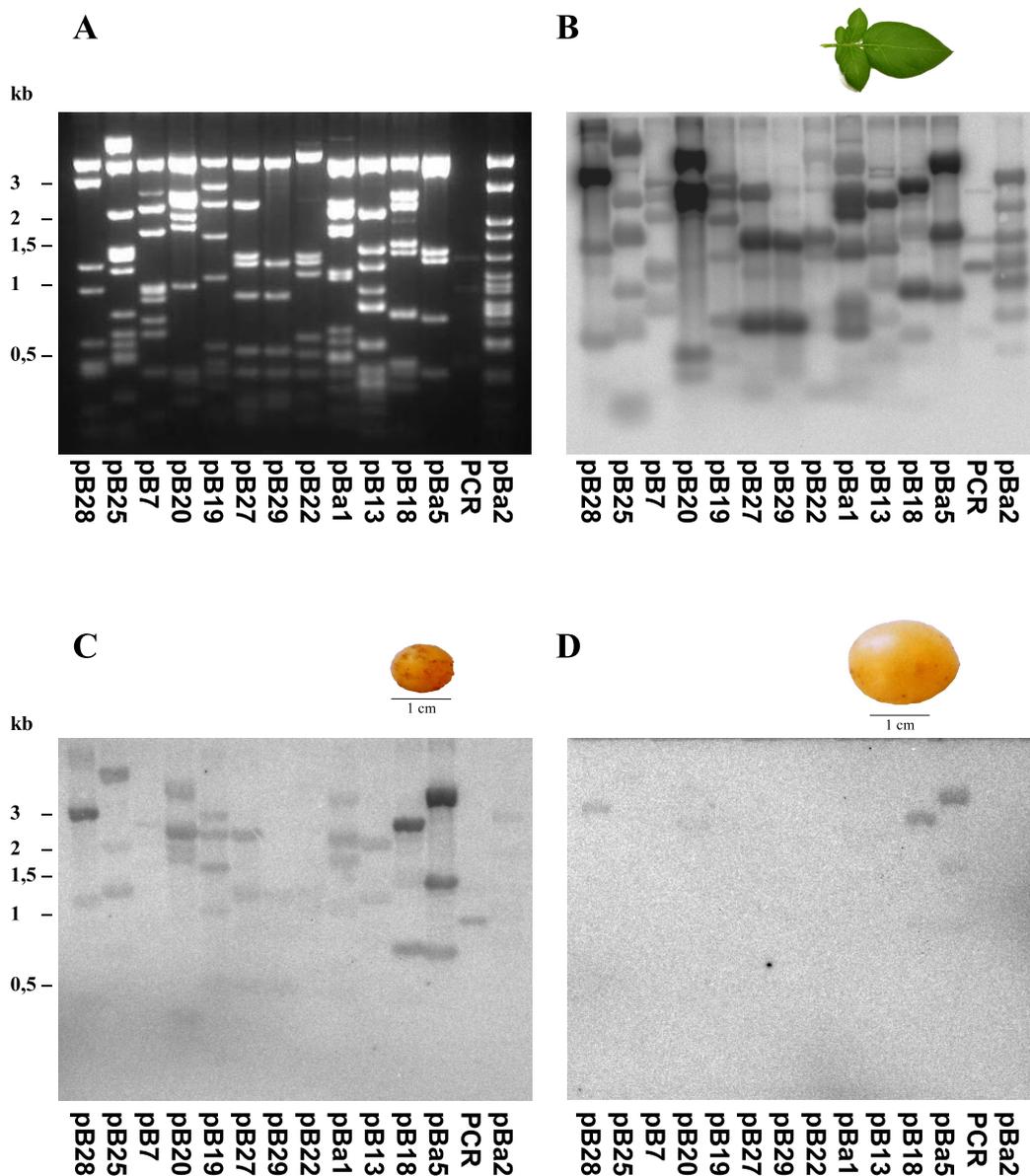


Abb. 10: Analyse von 'Run-On'-Transkripten aus je 1×10^7 Chloroplasten und Amyloplasten verschieden grosser Knollen durch Hybridisierung mit pDNA - Fragmenten, die in ihrer Gesamtheit das Plastidengenom von Tabak repräsentieren. Die von SUGIURA *et al.* (1986) beschriebenen Subklone (s. 2.3) wurden mit *Bam*HI und *Eco*RI hydrolysiert und in einem 1 %igen (w/v) Agarosegel aufgetrennt. Der von diesen Fragmenten nicht repräsentierte Teil wurde über PCR amplifiziert und ebenfalls mit *Bam*HI und *Eco*RI hydrolysiert. (A) Agarosegel mit den durch Ethidiumbromid angefärbten DNA-Fragmenten. (B) Autoradiogramm nach Hybridisierung mit 'Run-on'-Transkripten aus 1×10^7 Chloroplasten. (C) Autoradiogramm nach Hybridisierung mit 'Run-on'-Transkripten aus 1×10^7 Amyloplasten, die aus Knollen mit einer durchschnittlichen Länge von 0,75 - 1,5 cm bzw. (D) 1,5 - 2 cm isoliert wurden (s. 2.9.1).

3.1.3 Transkriptionsanalyse der einzelnen pDNA - Bereiche

Eine detaillierte Analyse der Transkriptionsspezifität in Amyloplasten der Kartoffelknolle war nach Zuordnung der durch den Verdau mit *Bam*HI und *Eco*RI entstandenen Fragmente der Plastidengenomklone möglich (Abb. 11 - 16). Im folgenden ist beispielhaft die detaillierte Auswertung von sieben Plastidengenomklonen gezeigt. Die Ergebnisse für die restlichen Fragmente sind dem Anhang zu entnehmen.

3.1.3.1 Subklon pTB28 Der Subklon pTB28 (Abb. 11) repräsentiert den Übergang zwischen dem 'inverted repeat' IRA und der 'large single copy region' (LSC, Abb. 2). Auf diesem Fragment sind die Haushaltsgene *matK*, *rpl2*, *rpl23*, *trnH*-GUG, *trnK*-UUU, das Photosynthesegen *psbA* und der offene Leserahmen *ycf2* lokalisiert. Bis auf das

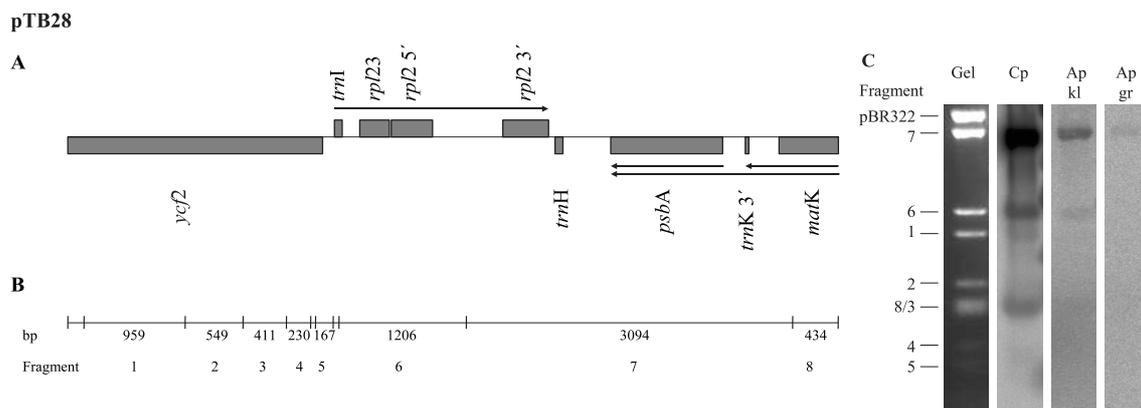


Abb. 11: 'Run-On'-Analyse des pDNA-Fragments B28 aus Tabak. (A) Schematische Darstellung der Gene auf dem pDNA-Fragment B28. Transkriptinseinheiten und -richtung sind durch Pfeile markiert. (B) Restriktionskarte des Fragments nach Verdau mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Eco*RI in Relation zur Lage der Gene. Die Größe der Fragmente ist angegeben. (C) Restriktionsfragmente des pDNA-Subklons pTB28 nach gelelektrophoretischer Auftrennung (Gel) und die Autoradiogramme nach der Hybridisierung mit 'Run-on'-Transkripten aus Chloroplasten (Cp), Amyloplasten (Ap) aus Knollen mit einer durchschnittlichen Größe von 0,75 - 1,5 cm (kl) bzw. 1,5 - 2,5 cm (gr) sind gezeigt. Die DNA-Fragmente sind entsprechend der Position in B nummeriert.

ycf2-Transkript lassen sich in Amyloplasten aus kleinen Kartoffelknollen die zugehörigen Transkripte aller Gene nachweisen. In Amyloplasten aus älteren Kartoffelknollen hybridisiert nur noch das 3094 bp grosse Fragment, auf dem die beiden *trnAs*, *trnH*-GUG und

trnK-UUU, das Photosynthesegen *psbA* und das Gen *matK*, das für eine Maturase kodiert, lokalisiert sind. In diesem Fall ist das Signal auf *psbA* oder *trnH* zurückzuführen, da vom Gen *trnK*-UUU nur das 3'-Exon auf diesem Fragment liegt und ein entsprechendes Transkript des 5'-Exons nicht detektiert wurde (Subklon pTB25, Abb. 12). Dieses Intron wird von dem 434 bp großen Fragment dieses Subklons repräsentiert, welches in Amyloplasten aus großen Knollen nicht mit markierten Transkripten hybridisiert. Transkripte des Gens *rpl2* sind ebenfalls in Amyloplasten aus großen Knollen auszuschließen, da dieses Gen mit den Genen *trnI*-CAU, *rpl2* und *rpl23* eine Transkriptionseinheit bildet und mit dem 1206 bp großen Fragment ebenfalls keine Transkripte detektiert werden konnten.

3.1.3.2 Subklon pTB25 Das Fragment B25 (Abb. 12) grenzt an das Fragment B28 im Bereich des Gens *matK*.

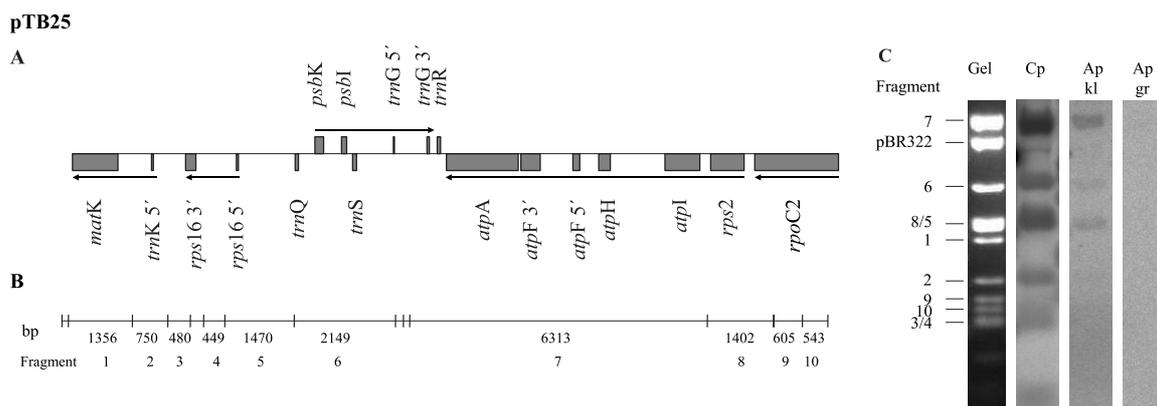


Abb. 12: 'Run-on'-Analyse des pDNA-Fragments B25 aus Tabak. (A) Schematische Darstellung der Gene auf dem pDNA-Fragment B25. Transkriptionseinheiten und -richtung sind durch Pfeile markiert. (B) Restriktionskarte des Fragments nach Verdau mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Eco*RI in Relation zur Lage der Gene. Die Größe der Fragmente ist angegeben. (C) Restriktionsfragmente des pDNA-Subklons pTB25 nach gelelektrophoretischer Auftrennung (Gel) und die Autoradiogramme nach der Hybridisierung mit 'Run-on'-Transkripten aus Chloroplasten (Cp), Amyloplasten (Ap) aus Knollen mit einer durchschnittlichen Größe von 0,75 - 1,5 cm (kl) bzw. 2 - 2,5 cm (gr) sind gezeigt. Die DNA-Fragmente sind entsprechend der Position in B numeriert.

Zusätzlich befinden sich auf dem Fragment B25 die Gene für *trnQ*-UUG, *trnR*-UCU, *rps16*, die Transkriptionseinheiten *rps2-atpI-atpH-atpF-atpA*, *psbK-psbI-trnG*-UCC und

das 3'-Ende des Operons *rpoB-rpoC1-rpoC2*. Von diesen Transkriptionseinheiten wird in den Amyloplasten aus jungen Knollen eindeutig das Transkript des Operons *rps2-atpI-atpH-atpF-atpA* gebildet. Ausserdem lassen sich die Transkripte der Transkriptionseinheit *psbK-psbI-trnG-UCC*, *trnQ-UUG* und *trnR-UCU* nachweisen. Allerdings ist eine eindeutige Zuordnung der erhaltenen Signale zum transkribierten Gen nicht durchführbar, da alle drei aufgeführten Transkriptionseinheiten auf einem Fragment liegen. Weiterhin lässt sich die Transkription von *trnK-UUU* vermuten, da ein Signal von dem 750 bp großen Fragment erhalten wird. Der eindeutige Nachweis der Transkription dieses Gens ist allerdings nicht zu führen, da kein Signal von dem im Intron dieses Gens liegende Gen *matK* erhalten wird, das auf dem 1356 bp großen Fragment lokalisiert ist. In Amyloplasten, die aus großen Knollen isoliert wurden, findet keine Transkription der Gene auf diesem Fragment statt.

3.1.3.3 Subklon pTB19 Alle Gene die auf dem plDNA-Fragment B19 lokalisiert sind, werden in Amyloplasten aus kleinen Knollen transkribiert (Abb. 13).

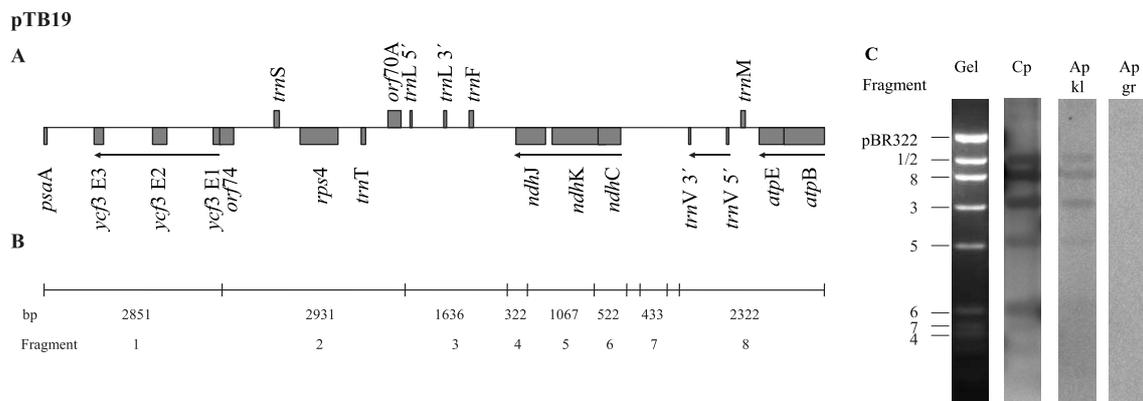


Abb. 13: 'Run-on'-Analyse des plDNA-Fragments B19 aus Tabak. (A) Schematische Darstellung der Gene auf dem plDNA-Fragment B19. Transkriptionseinheiten und -richtung sind durch Pfeile markiert. (B) Restriktionskarte des Fragments nach Verdau mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Eco*RI in Relation zur Lage der Gene. Die Größe der Fragmente ist angegeben. (C) Restriktionsfragmente des plDNA-Subklons pTB19 nach gelelektrophoretischer Auftrennung (Gel) und die Autoradiogramme nach der Hybridisierung mit 'Run-on'-Transkripten aus Chloroplasten (Cp), Amyloplasten (Ap) aus Knollen mit einer durchschnittlichen Größe von 0,75 - 1,5 cm (kl) bzw. 2 - 2,5 cm (gr) sind gezeigt. Die DNA-Fragmente sind entsprechend der Position in B nummeriert.

Dabei hybridisieren Transkripte mit Fragmenten auf denen, die Gene für die tRNAs *trnF*-GAA, *trnL*-UAA, *trnM*-CAU, *trnT*-UGU, *trnV*-UAC, das Gen für das ribosomale Protein *rps4* und die Gene für die offenen Leserahmen *ycf3*, *orf70A* und *orf74*. Diese Transkripte hybridisieren in Amyloplasten aus kleinen Knollen und Chloroplasten im gleichen Verhältnis zueinander, während in Amyloplasten aus großen Knollen keine Transkription von den Genen auf diesen Fragmenten festzustellen ist. Zusätzlich wird das Operon *ndhC* - *ndhK* - *ndhJ* in Amyloplasten aus kleinen Knollen transkribiert, aber im schwächerem Maß als in Chloroplasten.

3.1.3.4 Subklon pTBa1 Der Subklon pTBa1 repräsentiert die fünf Transkriptionseinheiten *psbE-psbF-psbL-psbJ*, *petL-petG-psaJ-rpl33-rps18*, *clpP-5' rps12-rpl20*, *psbB-psbT-psbH-petB-petD* und Teile des großen Operons *trnI-rpl23-rpl2-rps19-rpl22-rps3-rpl16 - rpl14-rps8-infA-rpl36-rps11-rpoA*, sowie die monocistronischen Gene *petA*, *orf99*, *orf103*, *trnW*, *trnP* und *psbN*.

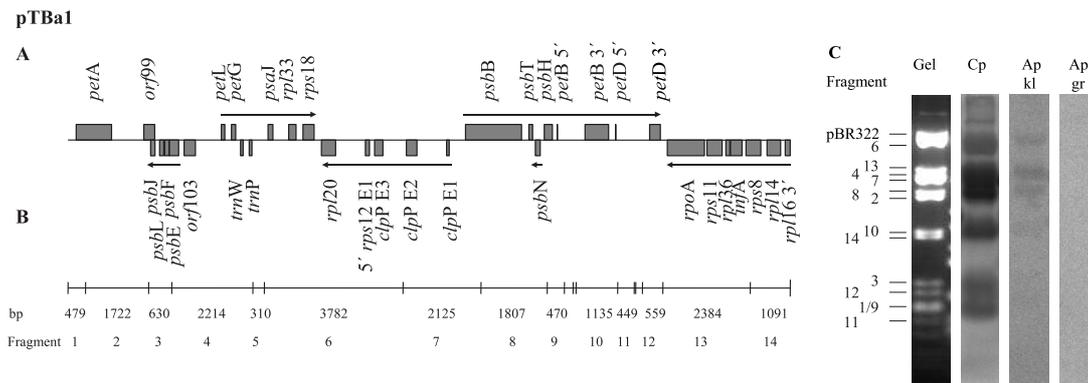


Abb. 14: 'Run-on'-Analyse des pDNA-Fragments Ba1 aus Tabak. (A) Schematische Darstellung der Gene auf dem pDNA-Fragment Ba1. Transkriptionseinheiten und -richtung sind durch Pfeile markiert. (B) Restriktionskarte des Fragments nach Verdau mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Eco*RI in Relation zur Lage der Gene. Die Größe der Fragmente ist angegeben. (C) Restriktionsfragmente des pDNA-Subklons pTBa1 nach gelelektrophoretischer Auftrennung (Gel) und die Autoradiogramme nach der Hybridisierung mit 'Run-on'-Transkripten aus Chloroplasten (Cp), Amyloplasten (Ap) aus Knollen mit einer durchschnittlichen Größe von 0,75 - 1,5 cm (kl) bzw. 2 - 2,5 cm (gr) sind gezeigt. Die DNA-Fragmente sind entsprechend der Position in B numeriert.

Von diesen Genen und Transkriptionseinheiten wird keines in Amyloplasten aus großen

Knollen transkribiert. In Amyloplasten aus kleinen Kartoffeln findet Transkription der auf dem 3782 bp großen Fragment liegenden Transkriptionseinheiten *petL-petG-psaJ-rpl33-rps18* und *clpP-5' rps12-rpl20* statt. Eine genauere Analyse ist bei diesen beiden Operonen schwierig, da das 2214 bp grosse Fragment, auf dem der 5'-Bereich des *petL-petG-psaJ-rpl33-rps18* Operons liegt, und das 2125 bp grosse Fragment, auf dem der 3'-Bereich des *clpP-5' rps12-rpl20* Operons liegt, ähnlich groß und eine Unterscheidung nicht möglich ist. Weiterhin zeigt sich, daß das Operon mit den zehn Genen für ribosomale Proteine, *rpoA* und *trnI* am Übergang zwischen dem 'inverted repeat' B (IRB) und der 'large single copy region' transkribiert wird.

3.1.3.5 Subklon pTB13 Die Analyse des plDNA-Fragments B13 (Abb. 15) zeigt, daß Transkripte des Operons *trnI-rpl23-rpl2-rps19-rpl22-rps3-rpl16-rpl14-rps8-infA-rpl36-rps11-rpoA* nur in Chloroplasten und Amyloplasten aus kleinen Knollen nachweisbar sind,

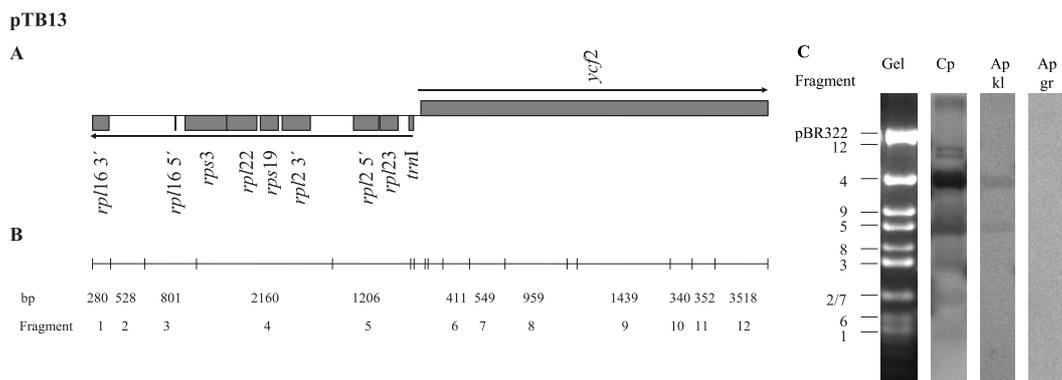


Abb. 15: 'Run-on'-Analyse des plDNA-Fragments B13 aus Tabak. (A) Schematische Darstellung der Gene auf dem plDNA-Fragment B13. Transkriptionseinheiten und -richtung sind durch Pfeile markiert. (B) Restriktionskarte des Fragments nach Verdau mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Eco*RI in Relation zur Lage der Gene. Die Größe der Fragmente ist angegeben. (C) Restriktionsfragmente des plDNA-Subklons pTB13 nach gelelektrophoretischer Auftrennung (Gel) und die Autoradiogramme nach der Hybridisierung mit 'Run-on'-Transkripten aus Chloroplasten (Cp), Amyloplasten aus Knollen mit einer durchschnittlichen Größe von 0,75 - 1,5 cm bzw. 2 - 2,5 cm sind gezeigt. Die DNA-Fragmente sind entsprechend der Position in B numeriert.

während der offene Leserahmen *ycf2* im 'inverted repeat' in Amyloplasten aus beiden Knollentypen nicht transkribiert wird.

3.1.3.6 Subklon pTB18 und pTBa5 Die beiden Subklone pTB18 und pTBa5 repräsentieren den ‘inverted repeat’ des Tabakplastoms (Abb. 16). Bei der Analyse dieser

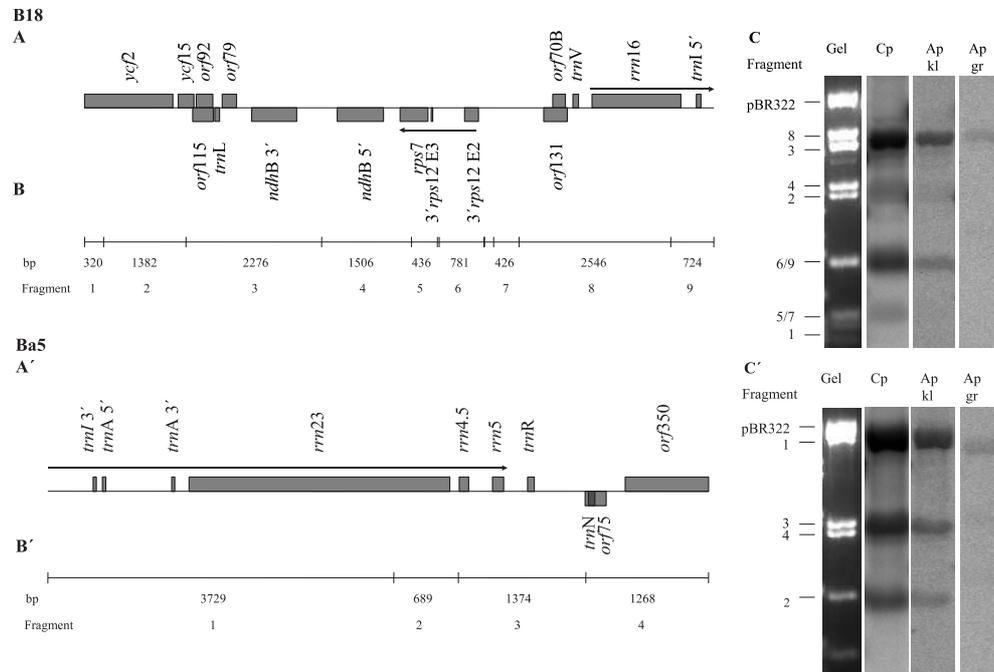


Abb. 16: ‘Run-on’-Analyse der pDNA-Fragmente B18 und Ba5 aus Tabak. (A) Schematische Darstellung der Gene auf den pDNA-Fragmenten B18 (A) und Ba5 (A'). Transkriptionseinheiten und -richtung sind durch Pfeile markiert. (B) Restriktionskarte der Fragmente nach Verdau mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Eco*RI in Relation zur Lage der Gene. Die Größe der Fragmente ist angegeben. (C) Restriktionsfragmente der pDNA-Subklone pTB18 (C) und pTBa5 (C') nach gelelektrophoretischer Auftrennung (Gel) und die Autoradiogramme nach der Hybridisierung mit ‘Run-on’-Transkripten aus Chloroplasten (Cp), Amyloplasten (Ap) aus Knollen mit einer durchschnittlichen Größe von 0,75 - 1 (kl) cm bzw. 2 - 2,5 cm gr) sind gezeigt. Die DNA-Fragmente sind entsprechend der Position in B/B' nummeriert.

beiden Fragmente zeigt sich, daß das ribosomale Operon in Amyloplasten aus kleinen und großen Knollen transkribiert wird, wobei sich auch hier eine Abnahme der Transkriptionsintensität zwischen den Amyloplasten aus kleinen Knollen und großen Knollen zeigt. Weiterhin ist ein Hybridisierungssignal auf dem 1506 bp großen Fragment des Subklons pTB18 zu erkennen. Dies lässt auf eine Transkription des Gens *ndhB* bzw. des Operons *3' rps12 - rps7* schließen. Das 2276 bp große Fragment, das das 3'-Exon des Gens *ndhB* repräsentiert, hybridisiert allerdings nicht. Da das ebenfalls 436 bp grosse Fragment hybri-

disiert, ist von einer Transkription des Operons 3' *rps12-rps7* auszugehen.

3.1.4 Zusammenfassung der Transkriptionsanalysen

Alle in Amyloplasten transkribierten Gene und Transkriptionseinheiten sind in Tabelle 4 zusammengefasst. Die in Amyloplasten aus großen Knollen transkribierten Gene wurden hervorgehoben. Die von der pDNA kodierte Gene lassen sich in 4 Gruppen einteilen. Die

Tab. 4: Liste der Transkriptionseinheiten, die in Amyloplasten der Kartoffelknollen transkribiert werden. Gene, die in Amyloplasten aus großen Knollen nachgewiesen wurden, sind hervorgehoben.

<u>ribosomale und transfer RNAs</u>			
<i>rrn16-trnI-trnA-rrn23-rrn4.5-rrn5</i>			
<i>trnI-rpl23-rpl2-rps19-rpl22-rps3-rpl16-rpl14-rps8-infA-rpl36-rps11-rpoA</i>			
<i>trnC</i>	<i>trnE-trnY-trnD</i>	<i>psbK-psbI-trnG</i>	<i>trnK</i>
<i>trnF</i>	<i>trnL</i>	<i>trnM</i>	<i>trnN</i>
<i>trnP</i>	<i>trnQ</i>	<i>trnR</i>	<i>trnS</i>
<i>trnS</i>	<i>trnT</i>	<i>trnV</i>	<i>trnV</i>
<i>trnW</i>	<i>trnL</i>	<i>trnfM</i>	<i>trnT</i>
<u>RNA-Polymerase und RNA-Prozessierung</u>			
<i>matK</i>	<i>rpoB-rpoC1-rpoC2</i>		
<u>ribosomale Proteine</u>			
<i>rps2-atpI-atpH-atpF-atpA</i>		<i>rps4</i>	<i>rps15</i>
<i>clpP-5' rps12-rpl20</i>		<i>rps16</i>	<i>rpl2</i>
<i>petL-petG-psaJ-rpl33-rps18</i>		<i>rpl23</i>	
<i>trnI-rpl23-rpl2-rps19-rpl22-rps3-rpl16-rpl14-rps8-infA-rpl36-rps11-rpoA</i>			
<u>Photosynthese- und Stoffwechselgene</u>			
<i>accD</i>	<i>atpB-atpE</i>	<i>psaC-ndhD</i>	<i>psbA</i>
<i>psbM</i>	<i>psbD-psbC-ycf9</i>	<i>ndhC-ndhK-ndh</i>	<i>ndhB</i>
<i>petA</i>	<i>rbcL</i>		
<u>offene Leserahmen</u>			
<i>orf70A</i>	<i>orf70B</i>	<i>orf74</i>	<i>orf75</i>
<i>orf79</i>	<i>orf11</i>	<i>orf92</i>	<i>orf130</i>
<i>orf131</i>	<i>orf350</i>	<i>ycf3</i>	<i>ycf6</i>

erste Gruppe stellt die Gene dar, deren Produkte in die plastidäre Genexpression involviert sind. Darunter befinden sich 4 Gene für die Untereinheiten der plastidär kodierten RNAP,

22 Gene für Untereinheiten der 30S und 50S Ribosomen, 4 Gene für ribosomale RNAs, ein Gen für eine kleine RNA, ein Gen für eine Untereinheit einer plastidären Proteinase und ein Gen für eine Maturase. Die Analyse der Transkription in Amyloplasten aus kleinen Knollen, hat ergeben, daß alle Gene, deren Produkte in die Genexpression involviert sind, transkribiert werden.

In Amyloplasten aus älteren Knollen ist nur noch die Transkription des ribosomalen Operon *rrn16-trnI-trnA-rrn23-rrn4.5-rrn5* und eines Gens, das auf dem 3094 bp großen Fragment des Subklons pTB25 liegt (Abb. 10 und 12), nachzuweisen. Dieses Fragment enthält die Gene *rpl2*, *trnH*, *trnK*, *psbA* und *matK*. Da neben dem ribosomalen Operon auch eins dieser Gene in Amyloplasten aus großen Knollen transkribiert wird, war es von besonderem Interesse, zu untersuchen, welche RNA in diesen Amyloplasten gebildet wird. Die Gene auf diesem Fragment wurden daher einer detaillierten Transkriptionsanalyse unterzogen.

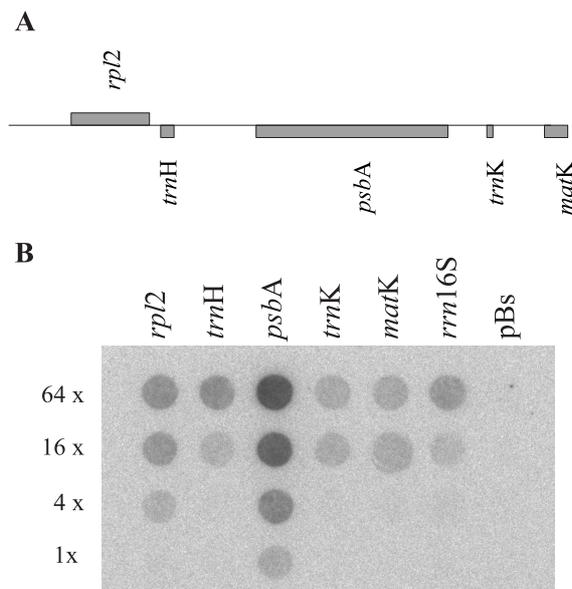


Abb. 17: Autoradiogramm der detaillierten Analyse der Transkription der Gene, die durch das 3094 bp große Fragment des Plastidengenomklons pTB25 repräsentiert werden. 'Run-on'-Transkripte aus 1×10^7 intakten Amyloplasten wurden auf einem 'Dot-Blot'-Filter, der verschiedene für Plastiden spezifische DNA - Sonden in jeweils vier verschiedenen Verdünnungen trägt, hybridisiert. Die einzelnen 'Dots' repräsentieren 328 fmol (64x), 82 fmol (16x), 10,5 fmol (4x) und 5,125 fmol (1x) des jeweiligen Plasmids. Als Kontrolle dienten pBluescript (pBS) und eine Sonde für die 16S ribosomale RNA aus Gerste (*rrn16S*).

Abbildung 17 A zeigt eine schematische Abbildung des 3094 bp großen Restriktionsfragments des Subklons pTB25 mit den Genen *rpl2*, *psbA*, *trnK* und *matK* zueinander. Um Aufschluß darüber zu erhalten, welches dieser Gene in Amyloplasten transkribiert wird, wurden Sonden für diese Gene aus Kartoffel-Gesamt-DNA amplifiziert und auf einem ‘Dot-Blot’-Filter verwendet. Abbildung 17 B zeigt das Autoradiogramm einer Hybridisierung dieses Filters mit ‘Run-on’-Transkripten von Amyloplasten aus Knollen von 1 cm - 2,5 cm Durchmesser. Die Untersuchungen zeigen, daß alle auf diesem Bereich der pDNA gelegenen Gene transkribiert werden. Die Hybridisierung ergab, daß die Transkription von *psbA* stärker als die der 16S ribosomalen RNA erscheint (Abb. 17 B). Dieser ungewöhnliche Befund läßt sich damit erklären, daß bei diesem Versuch eine heterologe Sonde für die 16S ribosomale RNA aus Gerste verwendet wurde. Dieser Befund ist jedoch umso erstaunlicher, da das Gen *psbA* für das D1-Protein des Photosystem II kodiert, obwohl Amyloplasten keine Photosynthese betreiben. Zudem besitzt dieses Gen nur einen Promotor für die PEP (ALLISON *et al.*, 1996), die nach einem Modell von HESS und BÖRNER (1999) in nicht grünen Plastiden nicht aktiv ist. Aus diesem Grund wurden im weiteren Verlauf Analysen durchgeführt, die Aufschluß darüber geben sollten, welche RNAP in den Amyloplasten der Kartoffelknolle aktiv ist.

3.1.5 Analysen zur RNAP-Aktivität in Amyloplasten

Die pDNA wird von mindestens zwei RNA-Polymerasen (NEP und PEP) transkribiert, die unterschiedliche Promotoren nutzen. Aufgrund der Promotorstruktur wurden die Plastidengene in drei Klassen eingeteilt: Gene die lediglich einen PEP - Promotor (1), die nur einen NEP - Promotor (2) und die beide Promotortypen besitzen (3) (HAJDUKIEWICZ *et al.*, 1997). In Amyloplasten ist nach den vorliegenden Untersuchungen *psbA* das am stärksten transkribierte Gen (Abb. 10). Das Gen kodiert für das D1 - Protein des Photosystems II und ist nach HAJDUKIEWICZ *et al.* (1997) in Klasse eins einzuteilen, da es nur einen Promotor für die PEP besitzt. Um mit einer unabhängigen Methode zu untersuchen, ob in Amyloplasten tatsächlich die PEP aktiv ist, wurden Analysen zur Promotoraktivität in Amyloplasten durchgeführt. Die Transkriptionsstarts des ribosomalen Operons wurden anhand von ‘Primer-Extension’-Analysen bestimmt, da die Transkription dieses Operon

bis in späte Stadien der Knollenentwicklung anhält, dieses Operon von beiden RNAPs transkribiert wird und diese Promotoren bereits ausführlich beschrieben sind (LERBS-MACHE, 2000).

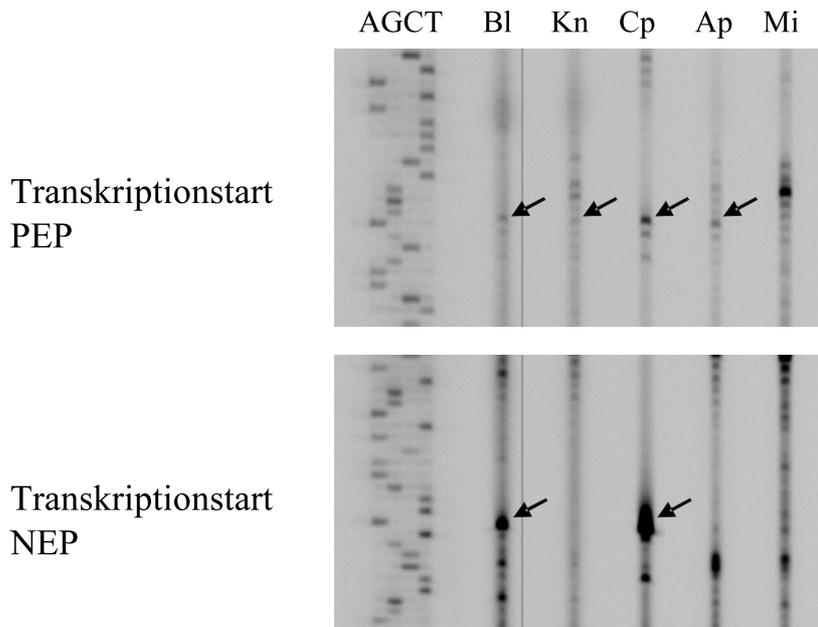


Abb. 18: Bestimmung der Transkriptionstarts des ribosomalen Operons in Amyloplasten. Die mittels Sequenzreaktion ermittelte Nukleotidreihenfolge (AGCT, s. 2.4.7) ist neben den 'Primer-Extension'-Reaktionen (s. 2.9.2) von (Bl) Blatt-Gesamt-RNA, (Kn) Knollen-Gesamt-RNA, (Cp) Chloroplasten-, (Ap) Amyloplasten- und (Mi) Mitochondrien-RNA aufgetragen. Die Transkriptionsstarts der unterschiedlichen RNAP sind durch Pfeile markiert.

Zu diesem Zweck wurde RNA aus ganzen Blättern und aus Chloroplasten einerseits und ganzen Knollen und Amyloplasten sowie auch Mitochondrien isoliert (s. 2.6.1) und einer 'Primer-Extension'-Analyse unterzogen (s. 2.9.2). In Knollen und Amyloplasten läßt sich nur das Primärtranskript detektieren, das auf eine Transkriptionsinitiation der plastidär kodierten RNAP zurückzuführen ist. In Blättern und Chloroplasten ist neben dem Primärtranskript, das auf eine PEP-abhängige Transkription zurückzuführen ist auch das Primärtranskript das durch eine NEP-abhängige Transkription entsteht, nachzuweisen. Die Länge dieses Primärtranskripts weicht 9 Nukleotide von der Länge des für Tabak be-

schriebenen Primärtranskripts ab. Durch weitere Experimente mit einer anderen ‘Primer‘-Kombination konnte allerdings das längere Primärtranskript für Kartoffelpflanzen bestätigt werden. In der RNA aus Amyloplasten sind zusätzliche Abbrüche der Reaktion zu erkennen, die sich allerdings auf die Kontamination mit Mitochondrien zurückführen lassen. Da in Mitochondrien kein spezifischer Abbruch auf Höhe des PEP-abhängigen Primärtranskripts des ribosomalen Operons zu detektieren ist, ist davon auszugehen, daß in Amyloplasten der Kartoffelknollen die Transkriptionsaktivität hauptsächlich auf die plastidenkodierte RNAP zurückzuführen ist.

3.2 Analyse der Transkriptzusammensetzung in Amyloplasten der Kartoffelknolle

Neben der Transkription stellt die differentielle Stabilisierung einzelner Transkripte einen weiteren wichtigen Kontrollpunkt der Genexpression dar. Aussagen über eine differentielle Stabilisierung von Transkripten in Amyloplasten lassen sich durch den Vergleich der relativen Transkriptionsraten und der Transkriptionakkumulation in den untersuchten Organellen zeigen. Der Nachweis akkumulierter Transkripte erfolgte durch Markierung der RNA am 3'-Ende durch Kopplung von radioaktiv markierten 3'-5'- α -Bisphosphat-CTP durch die T4 - RNA - Ligase (s. 2.10.1). Die im Rahmen dieser Arbeit vorgenommene Markierung durch Ligation bietet den Vorteil, daß im Vergleich zu Markierungen durch eine Reverse Transkription (cDNA-Synthese) jedes Transkript nur einmal markiert wird. Die markierte RNA wurde anschließend mit den bereits beschriebenen Filtern, die das gesamte Plastidengenom repräsentieren, hybridisiert (2.3). Wie für die Transkriptionsanalysen wurden in den Analysen zur Transkriptzusammensetzung Amyloplasten aus unterschiedlich großen Knollen untersucht.

Beim Vergleich der Autoradiogramme der Hybridisierungen von markierter RNA aus Chloroplasten, Amyloplasten aus kleinen Knollen und Amyloplasten aus großen Knollen in Abbildung 19 zeigt sich, daß, trotz der Abnahme der Transkriptionsrate, die Hybridisierungsmuster von Amyloplasten aus kleinen und großen Knollen identisch sind. Weiterhin weisen die Transkriptmuster von Chloroplasten und Amyloplasten nur wenige Unterschiede auf, obwohl die Transkriptionsmuster dieser beiden Plastidentypen sich drastisch unterscheiden (Abb. 10). Während in Chloroplasten alle Bereiche der pDNA und in Amyloplasten nur wenige Gene transkribiert werden (Abb. 10), akkumulieren die Transkripte zu nahezu gleicher Zusammensetzung. Zu den wenigen Transkripten, die in Chloroplasten im Vergleich zu Amyloplasten stärker akkumulieren, gehören die, die mit dem 6313 bp großen Fragment des Subklons pTB25, dem 1636 bp großen Fragment des Subklons pTB19 hybridisieren.

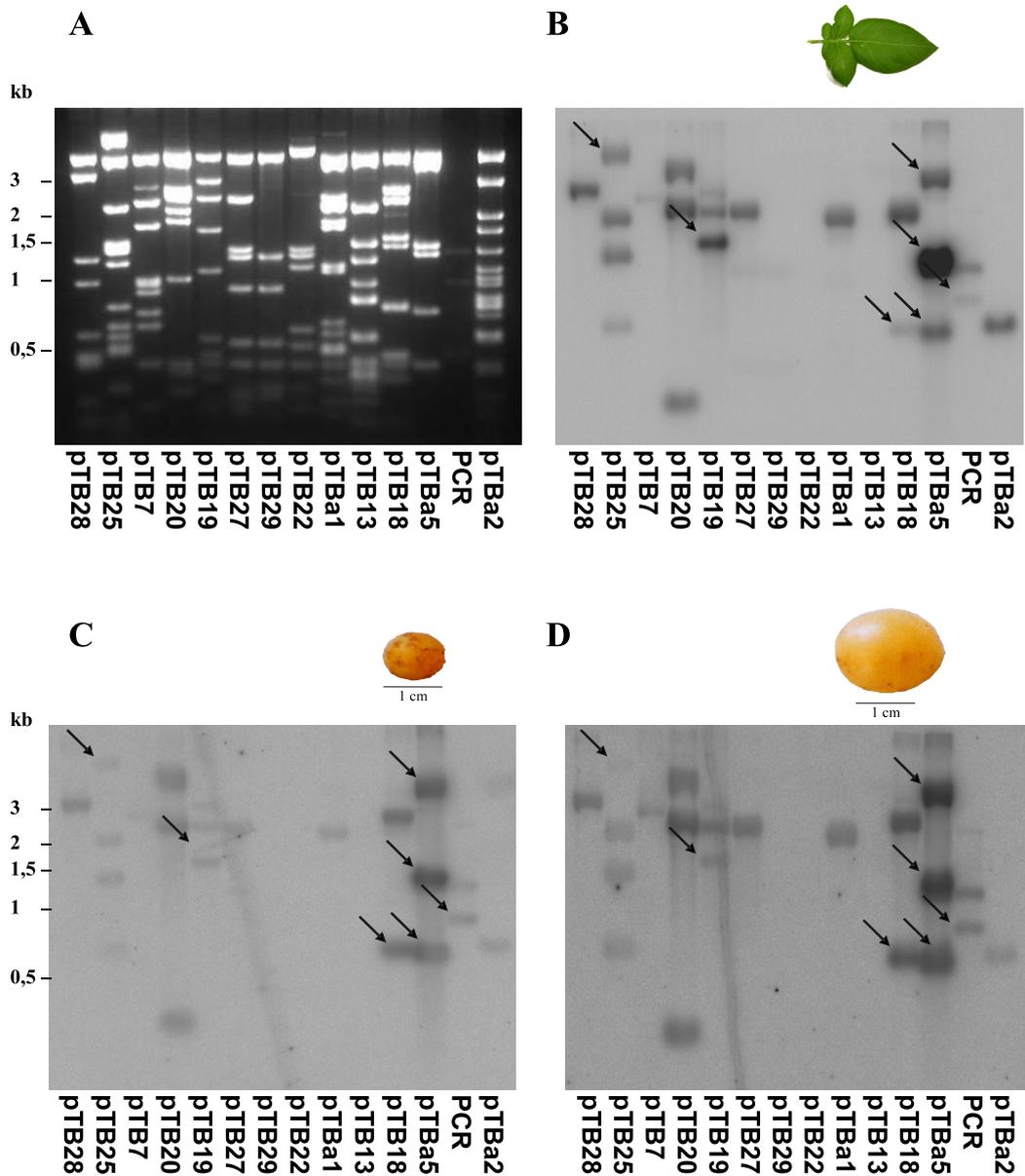


Abb. 19: Analyse der Transkriptzusammensetzung aus Chloroplasten und Amyloplasten verschieden großer Knollen durch Hybridisierung mit pDNA - Fragmenten, die in ihrer Gesamtheit das Plastidengenom von Tabak repräsentieren. Die von SUGIURA *et al.* (1986) beschriebenen Subklone (2.3) wurden mit *Bam*HI und *Eco*RI hydrolysiert und in einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt. Der von diesen Fragmenten nicht repräsentierte Teil wurde über PCR amplifiziert und ebenfalls mit *Bam*HI und *Eco*RI hydrolysiert. (A) Agarose-Gel mit den durch Ethidiumbromid angefärbten DNA-Fragmenten. (B) Autoradiogramm nach Hybridisierung mit am 3'-Ende markierter RNA aus Chloroplasten. (C) Autoradiogramm nach Hybridisierung mit endmarkierter RNA aus Amyloplasten, die aus Knollen mit einer durchschnittlichen Länge von 0,75 - 1 cm bzw. (D) 1,5 - 2 cm isoliert wurden. Die Pfeile markieren in Chloroplasten und Amyloplasten unterschiedlich stark akkumulierende Transkripte.

Alle Transkripte, die in Amyloplasten und Chloroplasten zu gleicher Stöchiometrie akkumulieren, wurden in Tabelle 5 zusammengefasst. Es konnte in Amyloplasten eine stärkere Akkumulation von Transkripten beobachtet werden, die mit dem 724 bp - Fragment des Subklons pTB18 und dem 941 bp Fragments des PCR - Produkts hybridisieren. Schließlich konnte eine Verschiebung der relativen Stärke der Hybridisierungssignale für alle Fragmente des Subklons pTBa5 in Amyloplasten beobachtet werden. Diese Transkripte wurden in Abbildung 20 - 22 durch Zuordnung der Genkarte zu den Restriktionsfragmenten detaillierter dargestellt.

Tab. 5: Gene der Transkripte, die in Amyloplasten und Chloroplasten zu gleicher stöchiometrischer Zusammensetzung akkumulieren.

transfer RNAs		ribosomale Proteine	Photosynthesegene
<i>trn-A-UGC</i>	<i>trn-R-ACG</i>	<i>rpl2</i>	<i>atpE</i>
<i>trn-C-GCA</i>	<i>trn-Y-GUA</i>	<i>rpl32</i>	<i>psaA</i>
<i>trn-D-GUC</i>	<i>trn-S-GCU</i>	<i>rpl36</i>	<i>psbA</i>
<i>trn-E-UUC</i>	<i>trn-S-GGA</i>	<i>rps11</i>	<i>psbC</i>
<i>trn-G-GCC</i>	<i>trn-S-UGA</i>	<i>rps12</i>	<i>psbD</i>
<i>trn-M-CAU</i>	<i>trn-T-GGU</i>	<i>rps14</i>	<i>psbE</i>
<i>trn-H-GUG</i>	<i>trn-V-GAC</i>	<i>rps16</i>	<i>psbI</i>
<i>trn-Q-UUG</i>	<i>trn-V-UAC</i>	<i>rps2</i>	<i>psbK</i>
<i>trn-fM-CAU</i>	<i>trn-W-CCA</i>	<i>rps4</i>	<i>petG</i>
			<i>petL</i>
offene Leserahmen			
<i>orf103</i>	<i>orf105</i>	<i>orf131</i>	<i>orf350</i>
<i>orf70B</i>	<i>ycf3</i>	<i>ycf6</i>	<i>ycf9</i>

In Amyloplasten und Chloroplasten lassen sich nach Zuordnung der jeweiligen Restriktionsfragmente 18 von 28 auf der pIDNA kodierten tRNAs nachweisen. Für die Gene *trnR-UCU*, *trnG-UCC*, *trnF-GAA*, *trnI-CAU*, *trnI-GAU*, *trnK-UUU*, *trnN-GUU* und *trnP-UGG* konnten keine RNAs detektiert werden. Da die Expression von tRNAs für die Translation von Proteinen ein entscheidender Faktor ist, wurde die Verteilung von Basentriplets

in den kodierenden Sequenzen des Tabakplastoms analysiert (*Codon Usage Database des Kazusa DNA research Institute*, <http://www.kazusa.jp.org/codon/chloroplast.html>). Bei diesen Analysen zeigte sich, daß die Kodonen der nicht akkumulierenden tRNAs, die am häufigsten verwendeten Triplets in Plastiden darstellen. Zudem zeigte sich bei einer Untersuchung der Kodonverteilung in den mRNAs, die in Amyloplasten akkumulieren, daß die nicht akkumulierenden tRNAs essentiell für die Expression dieser Proteine sind. In Chloroplasten und Amyloplasten aus kleinen Knollen werden jedoch alle tRNAs transkribiert (Abb. 10 und Tab. 4). Daher ist davon auszugehen, daß die Proteinbiosynthese zumindest in Amyloplasten aus kleinen Knollen vonstatten gehen kann, während sie in Amyloplasten aus großen Knollen zum Erliegen kommt. Zusätzlich zu den tRNAs sind 9 Transkripte von 22 Genen für ribosomale Proteine, die in Chloroplasten akkumulieren, auch in Amyloplasten zu finden. Davon kodieren 3 für Untereinheiten der 50S-Ribosomen und 5 für Untereinheiten der 30S-Ribosomen. Weiterhin lassen sich Transkripte von Untereinheiten aller vier in die Photosynthese involvierten Proteinkomplexe detektieren.

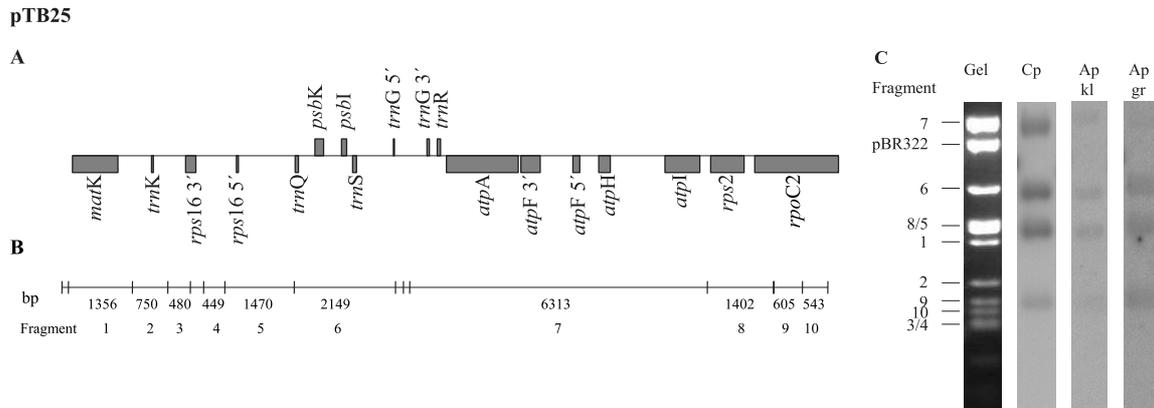


Abb. 20: Vergleichende Analyse der Transkriptzusammensetzung von Chloroplasten und Amyloplasten. (A) Schematische Darstellung der Gene auf dem pDNA-Fragment B25. (B) Restriktionskarte des Fragments nach Verdau mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Eco*RI in Relation zur Lage der Gene. Die Größe der Fragmente ist angegeben. (C) Restriktionsfragmente des pDNA-Subklons pTB25 nach gelelektrophoretischer Auftrennung (Gel) und die Autoradiogramme nach der Hybridisierung mit markierter RNA aus Chloroplasten (Cp), Amyloplasten aus Knollen mit einer durchschnittlichen Größe von 0,75 - 1 cm (Ap kl) und Amyloplasten aus Knollen mit einer durchschnittlichen Größe von 2 - 2,5 cm (Ap gr) sind gezeigt. Die jeweilige Nummer des Fragments ist links angegeben.

Im Gegensatz zu den in Tabelle 5 aufgeführten Transkripten, die in Amyloplasten und Chloroplasten zu gleichen stöchiometrischen Verhältnissen akkumulieren, sind einige mRNAs in Amyloplasten nicht nachweisbar. In diese Gruppe lassen sich die Transkripte einordnen, deren Gene von dem 6313 bp großen Fragment des Subklons pB25 repräsentiert werden. Auf diesem Fragment sind die Gene *atpA*, *atpF*, *atpH*, *atpI* (Abb. 20), die für die Unter-einheiten α , I, III und IV der ATPase kodieren, sowie die Gene für zwei tRNAs lokalisiert. Diese Transkripte sind eindeutig in Chloroplasten nachzuweisen, in Amyloplasten ist ein Hybridisierungssignal auf diesem Fragment allerdings nur schwach zu detektieren, obwohl diese mRNAs in Amyloplasten aus kleinen Knollen transkribiert werden (Abb. 10).

Ein weiteres Gen, dessen Transkript in Amyloplasten schwächer akkumuliert, befindet sich in der 'small single copy region' (SSC). Abbildung 21 zeigt den Subklon pTBa2, der die Gene der SSC enthält. Beim Vergleich der Signalintensitäten der auf dem Subklon pTBa2 hybridisierenden Transkripte aus Amyloplasten und Chloroplasten zeigt sich, daß ein akkumulierendes Transkript in Chloroplasten stabiler ist als in Amyloplasten. Ein genauer

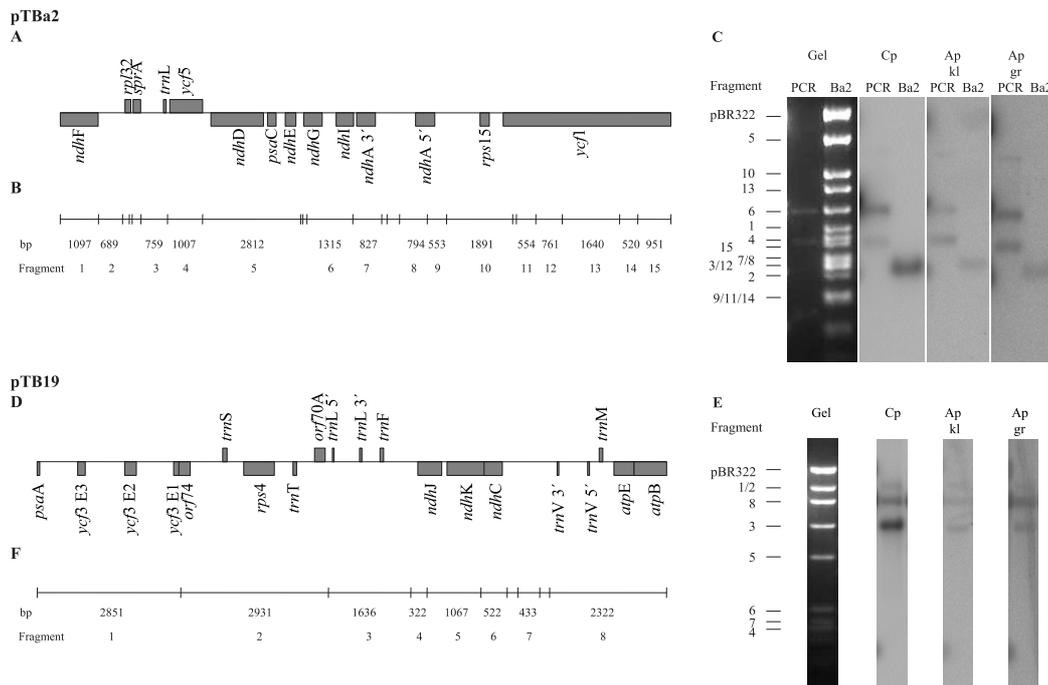


Abb. 21: Analyse der Transkriptzusammensetzung von Chloroplasten und Amyloplasten. (A + D) Schematische Darstellung der Gene auf den pDNA-Fragmenten Ba2 und B19. Zur Verdeutlichung der Signalunterschiede wurde zusätzlich das PCR-Fragment abgebildet. (B + F) Restriktionskarte der Fragmente nach Verdau mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Eco*RI in Relation zur Lage der Gene. Die Größe der Fragmente ist angegeben. (C + E) Restriktionsfragmente der pDNA-Subklone pTBa2 und B19 nach gelelektrophoretischer Auftrennung (Gel) und die Autoradiogramme nach der Hybridisierung mit markierter RNA aus Chloroplasten (Cp), Amyloplasten aus Knollen mit einer durchschnittlichen Größe von 0,75 - 1 cm (Ap kl) und Amyloplasten aus Knollen mit einer durchschnittlichen Größe von 2 - 2,5 cm (Ap gr) sind gezeigt. Die jeweilige Nummer des Fragments ist links angegeben.

Nachweis, um welches Transkript es sich hierbei handelt, ist schwierig durchzuführen, da sich auf dieser Höhe sehr viele, etwa gleich lange Restriktionsfragmente befinden. Ausschließen ist zunächst das Transkript des offenen Leserahmens *ycf1*, da für diesen Fall zu wenige Restriktionsfragmente hybridisieren. In Frage kämen lediglich die Transkripte der Untereinheit I der NADH Dehydrogenase *ndhA* und die tRNA-L-UAG. Die tRNA ist dreimal auf der pDNA mit unterschiedlichen Antikodonen kodiert (*trnL*-UAA: Position 49296, *trnL*-UAG: Position 116161 und *trnL*-CAA: Position 96430 und 146116 (IR)). Bei Analyse des 1636 bp großen Fragments des Subklons pTB19 (Abb. 21 B), das die Gene der

tRNAs *trnF*-GAA und *trnL*-UAA repräsentiert, zeigt sich, daß das Hybridisierungssignal in Amyloplasten ebenfalls schwächer als in Chloroplasten ist. Das Gen der *trnL*-CAA ist im ‘inverted repeat’ lokalisiert und wird von dem 2276 bp großen Fragment des Subklons pTB18 repräsentiert (Abb. 22), von dem in Amyloplasten ebenfalls kein Hybridisierungssignal erhalten wird. Daher ist davon auszugehen, daß in Amyloplasten keine der drei tRNAs akkumuliert.

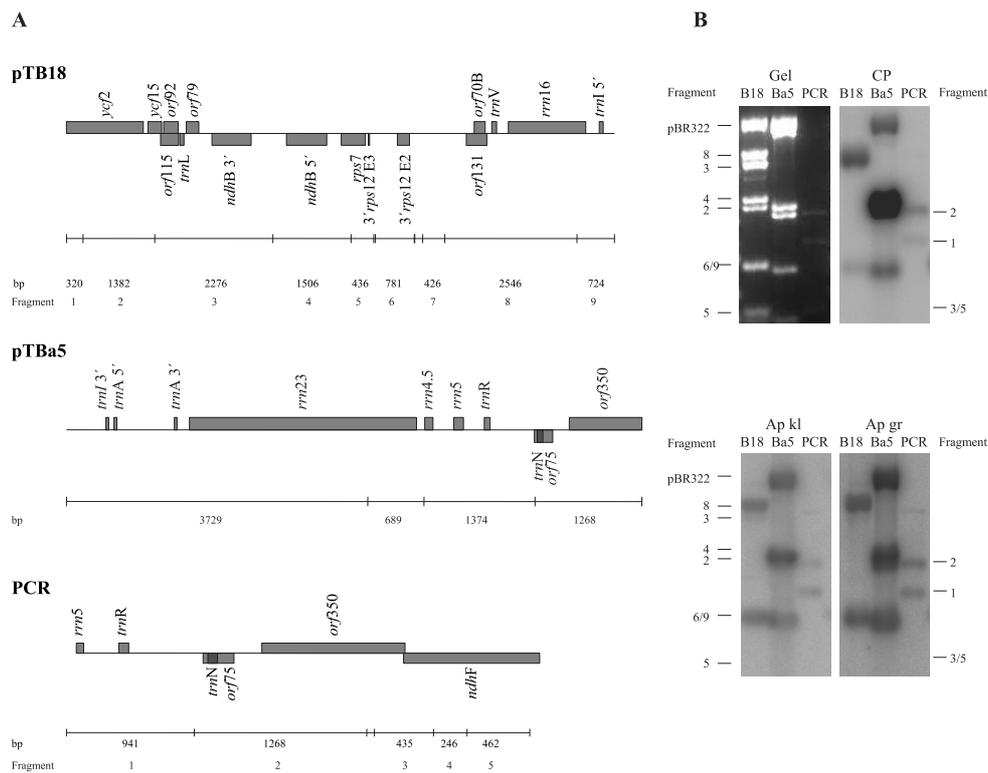


Abb. 22: Analyse der Transkriptzusammensetzung von Chloroplasten und Amyloplasten. (A) Schematische Darstellung der Gene auf den pDNA-Fragmenten B18, Ba5 und dem PCR-Fragment und Restriktionskarte der Fragmente nach Verdau mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Eco*RI in Relation zur Lage der Gene. Die Größe der Fragmente ist angegeben. (C) Restriktionsfragmente des pDNA-Subklons pTBa2 nach gelelektrophoretischer Auftrennung (Gel) und die Autoradiogramme nach der Hybridisierung mit markierter RNA aus Chloroplasten (Cp), Amyloplasten aus Knollen mit einer durchschnittlichen Größe von 0,75 - 1 cm (Ap kl) und Amyloplasten aus Knollen mit einer durchschnittlichen Größe von 2 - 2,5 cm (Ap gr) sind gezeigt. Die jeweilige Nummer des Fragments B18 ist links und die des PCR-Fragments ist rechts angegeben.

Neben den Transkripten, die in Amyloplasten instabil sind oder zu gleichen stöchiometrischen Verhältnissen wie in Chloroplasten akkumulieren (Tab. 5), zeigen die Hybridisierungsmuster Transkripte, die scheinbar in Amyloplasten stärker akkumulieren als in Chloroplasten (Abb. 19, pTB18 und PCR). Auf diesen beiden Fragmenten sind Teile des ribosomalen Operons lokalisiert (Abb. 22). Auf dem 724 bp großen Fragment des Subklons pTB18 befindet sich ein Teil des Gens für die 16S ribosomale RNA und das 5'-Exon der *trnI*-GAU. Das 941 bp große Fragment des PCR-Produkts repräsentiert einen Teil des Gens für die 5S ribosomale RNA und das nicht zu diesem Operon gehörende Gen *trnR*-ACG. Die Betrachtung der beiden Fragmente läßt den Schluß zu, daß eventuell das 3'-Exon von *rps12*, das auf dem 781 bp großen Fragment von pTB18 lokalisiert ist, und die tRNA-R-ACG besonders stark akkumulieren. Allerdings zeigt Subklon pTBa5, der den Großteil des ribosomalen Operon repräsentiert, nach Hybridisierung mit markierten Transkripten aus Amyloplasten eine eher gleichmäßige Verteilung der Signalintensitäten, während im Fall der Chloroplasten das 1374 bp große Fragment am stärksten hybridisiert.

Bei den Analysen zur Transkriptzusammensetzung in Amyloplasten und Chloroplasten, zeigt sich, daß in beiden Plastidentypen die Transkripte in annähernd gleichen stöchiometrischen Verhältnissen akkumulieren, obwohl die Transkription einiger der Gene in Amyloplasten aus größeren Knollen nicht nachweisbar ist (Abb. 10). In Amyloplasten akkumulieren keine Transkripte für Untereinheiten der ATPase und der Gene für *trnA*-L-UAA und *trnA*-L-UAG. Es stellt sich daher die Frage, ob in Amyloplasten Ribosomen vorhanden sind und welche Transkripte in Amyloplasten translatiert werden. Daher wurden im folgenden Analysen zur Translation in Amyloplasten angestellt.

3.3 Analysen zur Translation in Amyloplasten

Ein weiterer wichtiger Kontrollpunkt der Genexpression in Plastiden ist die Translation. Um mRNAs translatieren zu können, müssen die Plastiden einen funktionierenden Proteinbiosyntheseapparat besitzen. Ein direkter Nachweis von Translationsaktivität in Amyloplasten mittels radioaktiv markierter Aminosäuren führte nicht zum Erfolg. Das Standardprotokoll für Chloroplasten sieht vor, daß die Plastiden nach Inkubation im Reaktionspuffer sedimentiert und die Proteine nach Denaturierung gelelektrophoretisch aufgetrennt werden. Das Volumen der benötigten Menge an Amyloplasten überstieg allerdings bei weitem das Fassungsvermögen der Beladungstasche. Zudem würde die in den Amyloplasten enthaltene Stärke die Gelelektrophorese stören. Wenn im Anschluß an die Inkubation im Reaktionsgemisch eine Proteinextraktion durchgeführt wurde, kam es zu einer unspezifischen Markierung aller Proteine. Dies konnte durch Versuche mit BSA belegt werden. Anstelle der Translationsaktivität wurden daher Nachweise für die Existenz von ribosomalen Proteinen in Amyloplasten durchgeführt. Zusätzlich wurden Polysomen aus Amyloplasten isoliert und die mit Polysomen assoziierte RNA analysiert.

3.3.1 Nachweis ribosomaler Proteine in Amyloplasten

Der Proteinsyntheseapparat in Plastiden setzt sich aus einer 30S- und einer 50S-ribosomalen Untereinheit zusammen. Die 30S-ribosomale Untereinheit besteht aus mindestens 25 Proteinen (YAMAGUCHI *et al.*, 2000), während die 50S-ribosomale Untereinheit aus mindestens 33 Untereinheiten aufgebaut ist (YAMAGUCHI und SUBRAMANIAN, 2000). Mit Hilfe von Antikörpern, die gegen alle Proteine der 30S ribosomalen Untereinheit gerichtet sind (FEIERABEND *et al.*, 1988), wurde geprüft, ob diese Proteine in Amyloplasten der Kartoffelknolle vorhanden sind (Abb. 23).

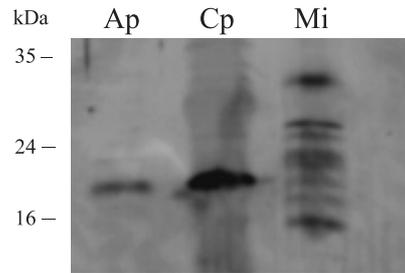


Abb. 23: Immunologischer Nachweis der 30S ribosomalen Untereinheit (FEIERABEND *et al.*, 1988) in Amyloplasten (Ap) und Chloroplasten (Cp). Als Kontrolle für Verunreinigungen wurden mitochondriale Proteine aufgetragen (Mi). Jede Spur wurde mit 10 μ g Proteine der jeweiligen Fraktion beladen.

Mit einem gegen die 30S-ribosomale Untereinheit gerichteten Antikörper wurde in Amyloplasten und Chloroplasten lediglich ein ca. 18 kDa großes Protein detektiert (Abb. 23). Im Proteinextrakt aus Mitochondrien wurden mit demselben Antikörper hingegen mehrere Proteine detektiert. Allerdings befindet sich darunter kein Protein von 18 kDa. Daher ist anzunehmen, daß in Amyloplasten ein ribosomales Protein nachgewiesen wurde.

Um zu prüfen, ob es in Amyloplasten aktive Ribosomen gibt, wurde die Prozessierung der mRNA des ribosomalen Proteins CS12 analysiert. Das Gen dieses Proteins ist in drei Exone unterteilt, die in zwei unterschiedlichen polycistronischen Einheiten transkribiert werden (Abb. 24). Exon 1 befindet sich mit *clpP* und *rpl20* in einem Operon und Exon 2 bildet in Tabak mit *rps7* eine dicistronische Einheit (HILDEBRANDT *et al.*, 1988). Die Prozessierung zum reifen Transkript erfordert zum einen eine endonukleolytische Hydrolyse und zum anderen *cis*- und *trans*-Spleissen (HILDEBRANDT *et al.*, 1988). Nur bei korrekter Prozessierung des Primärtranskripts ist eine Translation des zugehörigen Proteins zu erwarten. Zudem gibt es Hinweise, daß nur in Gegenwart von Ribosomen ein effizientes *trans*-Spleissen erfolgt (HÜBSCHMANN *et al.*, 1996). Zur Untersuchung der Prozessierung des *rps12*-Transkripts in Amyloplasten, wurde RNA aus Amyloplasten und Chloroplasten mit einer spezifischen Sonde für das zweite Exon von *rps12* hybridisiert (Abb. 24). In Amyloplasten läßt sich das reife *rps12*-Transkript nachweisen. Da die beiden Primärtranskripte erst durch *trans*-Spleissen zum korrekten Transkript reifen, ist davon auszugehen, daß in

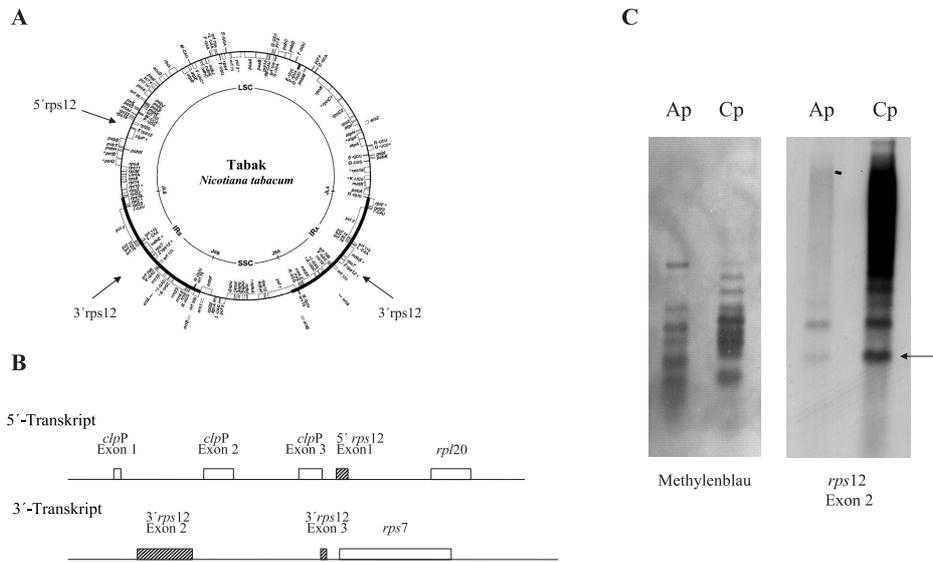


Abb. 24: Nachweis der korrekten Reifung des *rps12*-Transkripts in Amyloplasten der Kartoffelknolle. (A) Schematische Darstellung der Lage der 5'- und 3'-Transkripte von *rps12* auf dem Tabak-Plastom. (B) Struktur der beiden Primärtranskripte von *rps12*. (C) Methyleneblaufärbung und Autoradiogramm einer Membran mit je 10 μg RNA aus Amyloplasten und Chloroplasten nach Hybridisierung mit einer genspezifischen Sonde für Exon 2 von *rps12*. Der Pfeil zeigt das reife *rps12*-Transkript.

Amyloplasten Ribosomen vorhanden sind.

3.3.2 Translationsaktivität in Amyloplasten

Nach dem Nachweis ribosomaler Proteine und der korrekten Prozessierung des *rps12*-Transkripts war es von Interesse, zu klären, ob die Ribosomen in Amyloplasten translationsaktiv sind. Bei der Translation lagern sich mehrere Ribosomen auf einem mRNA-Strang nacheinander an. Diese Komplexe werden als Polysomen bezeichnet und können aufgrund ihrer Dichte durch Zentrifugation spezifisch angereichert werden. Je weiter eine mRNA im Dichtegradienten sedimentiert, desto stärker ist sie mit Ribosomen beladen. Dieser Gradient wird verglichen mit einem Gradienten, in dem die Polysomen durch Behandlung mit EDTA dissoziieren. In diesem Gradient findet man nur noch freie Ribosomen im oberen Bereich. Nach Fraktionierung des Gradienten kann die RNA-Zusammensetzung der verschieden weit sedimentierten Polysomen analysiert werden. Auf diesem Weg können intensiv translatierte von weniger stark translatierten Transkripten unterschieden werden.

Auf eine Größenunterteilung der Kartoffelknollen wurde verzichtet, da nicht genügend Ausgangsmaterial zur Verfügung stand. Zudem wurde keine Quantifizierung der isolierten Amyloplasten durchgeführt, da diese Methode sehr zeitaufwendig ist. Es wurde vielmehr darauf geachtet zügig und gekühlt zu arbeiten, um einen 'Run-off' der Ribosomen zu vermeiden. Abbildung 25 A zeigt die durch Dichtegradientenzentrifugation erhaltene RNA in den 10 verschiedenen Polysomenfraktionen. Die Polysomen sedimentieren im Saccharosegradienten bis Fraktion neun, woraus zu schliessen ist, daß die in Amyloplasten vorkommende RNA durchaus mit Ribosomen beladen ist. Durch Zugabe von EDTA konnten die Ribosomen von den Transkripten abgelöst werden, wodurch die RNA in dieser Kontrolle nicht so stark sedimentieren konnte und daher in den oberen Fraktionen dieses Saccharosegradienten verblieb. Außerdem wurde die RNA aus den 10 verschiedenen Fraktionen eines EDTA-Kontrollgradienten und eines Gradienten zur Isolierung von Polysomen gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf einer Membran immobilisiert. Durch Hybridisierung dieser Membran mit einer spezifischen Sonde für die 16S ribosomale RNA konnte in den sedimentierenden RNA-Fraktionen dieses Transkript eindeutig nachgewiesen werden, während es im EDTA-Kontrollgradienten nur in den oberen Fraktionen detektiert wurde (Abb. 25 B). Diese Analysen zeigen, daß in Amyloplasten der Kartoffelknolle Transkripte mit Ribosomen assoziiert sind, da sich ohne eine solche Assoziation keine Komplexe ausbilden, die in

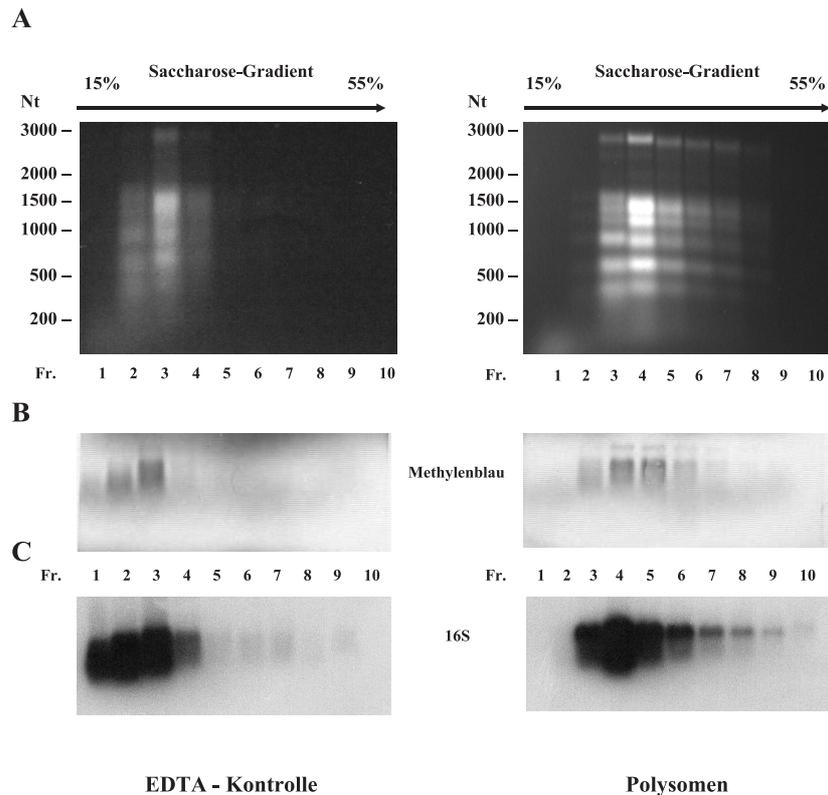


Abb. 25: Analyse von mit Polysomen assoziierter RNA aus Amyloplasten. (A) Gelfotos mit Ethidiumbromid gefärbter und gelelektrophoretisch aufgetrennter RNA nach Dichtegradientenzentrifugation der Ribosomen und Fraktionierung des Gradienten (s. 2.11.1). (B) Methylenblaufärbung gelelektrophoretisch aufgetrennter und auf eine Nylonmembran transferierter RNA der 10 verschiedenen Fraktionen eines mit und eines kein EDTA enthaltenden Saccharosegradienten. (C) Autoradiogramm der Hybridisierung der Membranen mit einer spezifischen Sonde für die 16S ribosomale RNA. EDTA-Kontrolle = Fraktionen des EDTA-enthaltenden Gradienten, in dem die Ribosomen dissoziieren; Polysomen = Fraktionen des Gradienten ohne Zugabe von EDTA.

einem Dichtegradienten sedimentieren.

Allerdings stellt sich die Frage, welche Transkripte in Amyloplasten translatiert werden und somit welche plastidenkodierte Proteine in Amyloplasten benötigt werden. Daher wurden im folgenden Analysen angestellt, die die Identifizierung der an Polysomen gekoppelten mRNAs erlauben.

3.3.3 Nachweis translatierter Transkripte in Amyloplasten

Nach Dichtegradientenzentrifugation und Fraktionierung des Kontroll- und Polysomengradienten wurden die aus dem Kontrollgradienten resultierenden RNA-Fractionen gelelektrophoretisch aufgetrennt und die Fractionen ermittelt, in denen nicht an Ribosomen gebundene Transkripte nachzuweisen sind. Die Fractionen mit Transkripten, die nicht an Ribosomen gebunden sind und die Fractionen mit an Ribosomen assoziierten Transkripten des Polysomengradienten wurden anschließend unterschieden und jeweils vereinigt (Abb. 26). Vor der Markierung und Hybridisierung der Transkripte mit den bereits beschriebenen Filtern, die das gesamte Tabak-Plastom repräsentieren (s. 2.3), musste die RNA zunächst aufgereinigt werden. Ohne diesen Zwischenschritt war keine Markierung möglich. Als beste Methode zur Aufreinigung dieser Transkripte erwies sich eine gelelektrophoretische Aufreinigung (s. 2.4.10). Die RNA wurde dazu in einem denaturierenden 'low-melt'-Agarose-Gel aufgetrennt und anschließend mittels Phenolextraktion aus diesem extrahiert. Abbildung 26 B zeigt das mit Ethidiumbromid gefärbte Gel, in dem intakte RNA aus den unterschiedlichen Fractionen aufgetrennt wurde. Bei diesen unterschiedlichen RNA-Populationen ist deutlich eine Veränderung im hoch- und niedermolekularen Bereich zu erkennen, während in den Hauptbanden kaum Veränderungen festzustellen sind.

Die in Abbildung 26 dargestellte Vorgehensweise führte zu den in Abbildung 27 dargestellten Autoradiogrammen. Die ribosomenfreien und -beladenen Transkripten wurden markiert und mit den Filtern, die das komplette Tabak-Plastom repräsentieren, hybridisiert (s. Kapitel 2.3 und 3.1.2). Abweichend von den in diesen Kapiteln beschriebenen Filtern konnte zwischenzeitlich das PCR-Fragment (pPCR) ebenfalls kloniert werden. Die in Abbildung 27 zusätzlich erhaltenen Signale im höhermolekularen Bereich des Klonen pPCR sind auf einen unvollständigen Verdau zurückzuführen.

Betrachtet man die mit Transkripten aus Chloroplasten erhaltenen Transkriptmuster, so sind nahezu alle akkumulierenden Transkripte an Ribosomen gebunden und sedimentieren im Dichtegradienten (Abb. 27 A). Ausnahmen bilden lediglich die dem Fragment des Subklons pTB25 und dem Fragment des Subklons pB18 zugehörigen Transkripte. Das Fragment des Subklons pTB25 repräsentiert den in Abbildung 20 ausführlich behandelten plDNA-Bereich, auf dem die Gene für die Untereinheiten α , I, III und IV der ATPase

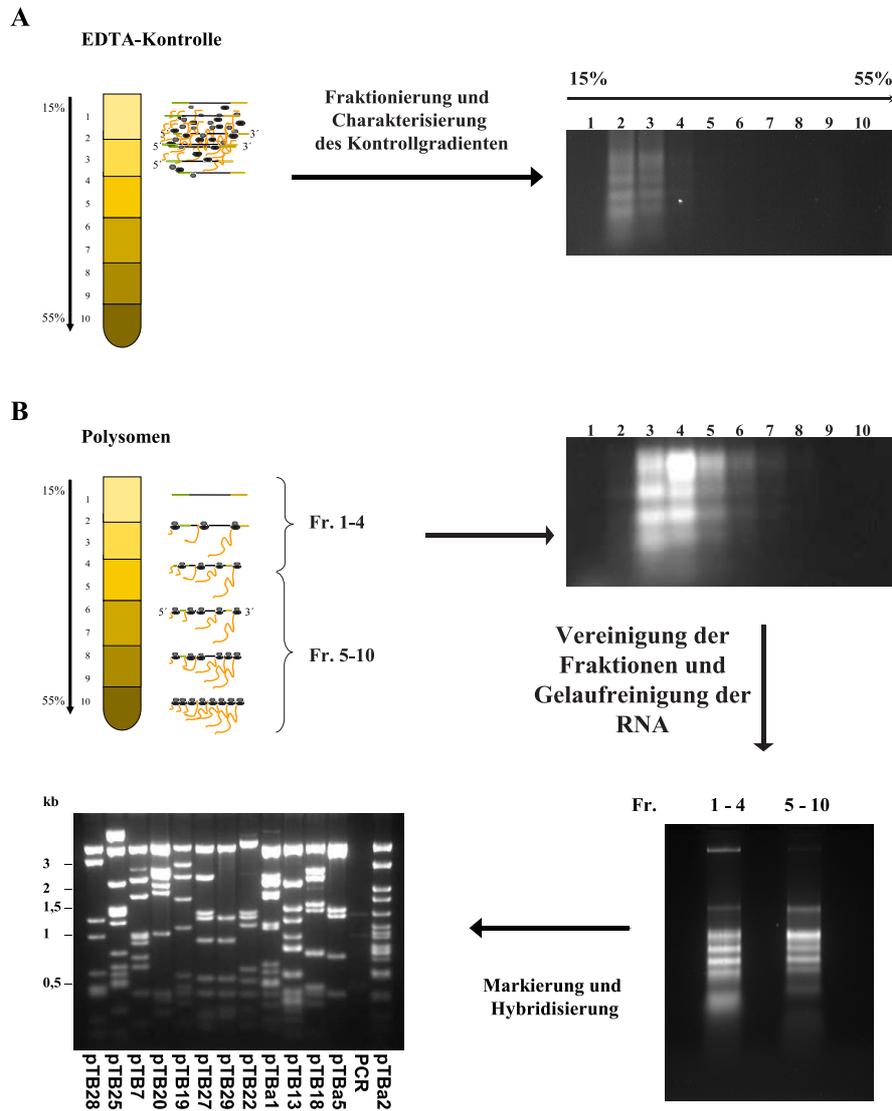


Abb. 26: Schematische Darstellung der Vorgehensweise zur Identifizierung translaterter Transkripte in Amyloplasten der Kartoffelknolle. (A) Charakterisierung des Gradienten am Beispiel einer Probe mit dissoziierten Polysomen (+ EDTA). (B) Vorgehensweise mit den durch Dichtegradientenzentrifugation erhaltenen Transkripte, die im Vergleich zur Kontrolle mit dissoziierten Polysomen als ribosomenbeladen bzw. -unbeladen eingestuft werden konnten.

und zwei tRNAs kodiert sind. Das zweite in Chloroplasten nicht mit Ribosomen besetzte Transkript ist eindeutig auf die mRNA des offenen Leserahmens *ycf2* zurückzuführen (s. Restriktionskarte Abb. 16).

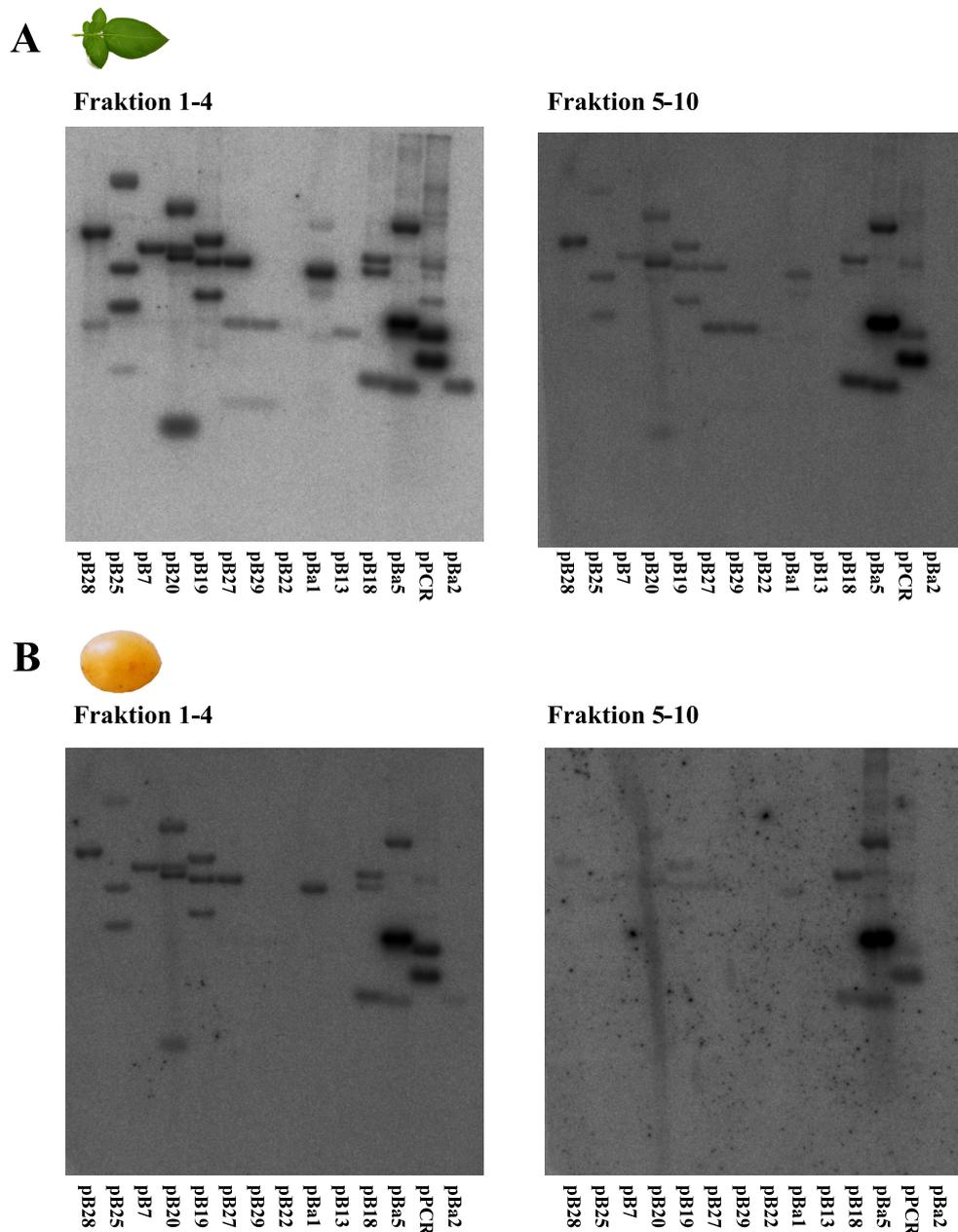


Abb. 27: Transkriptverteilung zwischen ribosomenfreien und ribosomenassoziierten Fraktionen aus Chloroplasten und Amyloplasten. Autoradiogramme der Hybridisierung von 3'-markierten Transkripten aus Chloroplasten (A) und Amyloplasten (B), die durch die in Abbildung 26 dargestellte Vorgehensweise erhalten wurden.

Beim analogen Vergleich der entsprechenden Autoradiogramme mit Transkripten aus Amyloplasten zeigt sich, daß in den sedimentierenden Polysomen-Fractionen kaum Transkripte zu finden sind (Abb. 27 B, Subklon pT28-pTB18 und pTBa2). Vielmehr sind die deutlichen Signale, die bei der Hybridisierung mit den ribosomengebundenen Transkripten auf den Subklonen pTB18, pTBa5 und pPCR zu erkennen sind, eindeutig auf Transkripte des ribosomalen Operons zurückzuführen. Es zeigt sich, daß in Amyloplasten im Vergleich zu Chloroplasten neben den ribosomalen RNAs sehr wenige mRNAs in der polysomalen Fraktion vorliegen (Abb. 27 A und B, Fraktion 5-10).

3.4 Ultrastrukturelle Untersuchungen der Amyloplastenentwicklung

Die Untersuchungen zur Genexpression in Amyloplasten zeigen, daß die Transkription während des Knollenwachstums stark abnimmt, die Transkriptabundanz in Amyloplasten verschieden großer Knollen allerdings gleich ist und von diesen Transkripten nur wenige, stark mit Ribosomen besetzt sind. In Anbetracht der deutlichen Abnahme der Transkription während des Knollenwachstums stellt sich die Frage, ob Amyloplasten aus kleinen Kartoffelknollen eventuell noch den Charakter von Proplastiden haben. Da Kartoffelknollen aus unterirdischen, d.h. etiolierten Sprossen entstehen, war auch denkbar, daß Amyloplasten auch aus Etioplasten entstehen. Um diese Frage zu beantworten, wurden in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Maria Mulisch aus der Zentralen Mikroskopie der CAU Kiel ultrastrukturelle Untersuchungen an unterirdischen Sprossen und Kartoffelknollen angefertigt. Dazu wurden zunächst Querschnitte von kleinen Knollen (ca. 0,5 cm Durchmesser) angefertigt. Da die in den Amyloplasten der Knolle stark angereicherte Stärke das Gewebe beim Schneiden zerstörte, konnten nur die Sprosse direkt am Knollenansatz analysiert werden.

Die ultrastrukturelle Untersuchung der Plastiden in diesen Sproßabschnitten ergab, daß die Amyloplasten weder aus typischen Proplastiden noch Etioplasten hervorgehen. Vielmehr entstehen die Amyloplasten aus Plastiden, die teilweise strukturierte Membranstapel (Abb. 28 A und B) bzw. stark verästelte Membranen (Abb. 28 D) enthalten. Die Plastiden enthalten zudem viele Plastoglobuli, was darauf schließen läßt, daß die Plastiden in diesem Sprossabschnitt viele Lipide enthalten. Weiterhin findet man in den Plastiden neben den Membranen auch kleine Stärkekörner (Abb. 28 C).

Die beobachteten Plastiden sind keine Proplastiden bzw. Etioplasten im klassischen Sinn. Die Ultrastruktur der Plastiden erinnert an frühe Stadien der Chloroplastenentwicklung. Für diese Vermutung spricht vor allem die Beobachtung der geordneten Membranstapel in Abbildung 28 B. Im Fall von Chloroplasten geht die Ausbildung geordneter Membranstapel mit der Biosynthese von Chlorophyll einher. Um zu prüfen, ob die Vorläufer der Amyloplasten ebenfalls Chlorophyll enthalten, wurden photometrische Bestimmungen der Pigmentzusammensetzung entlang eines unterirdischen Sprosses durchgeführt. Dazu wurde

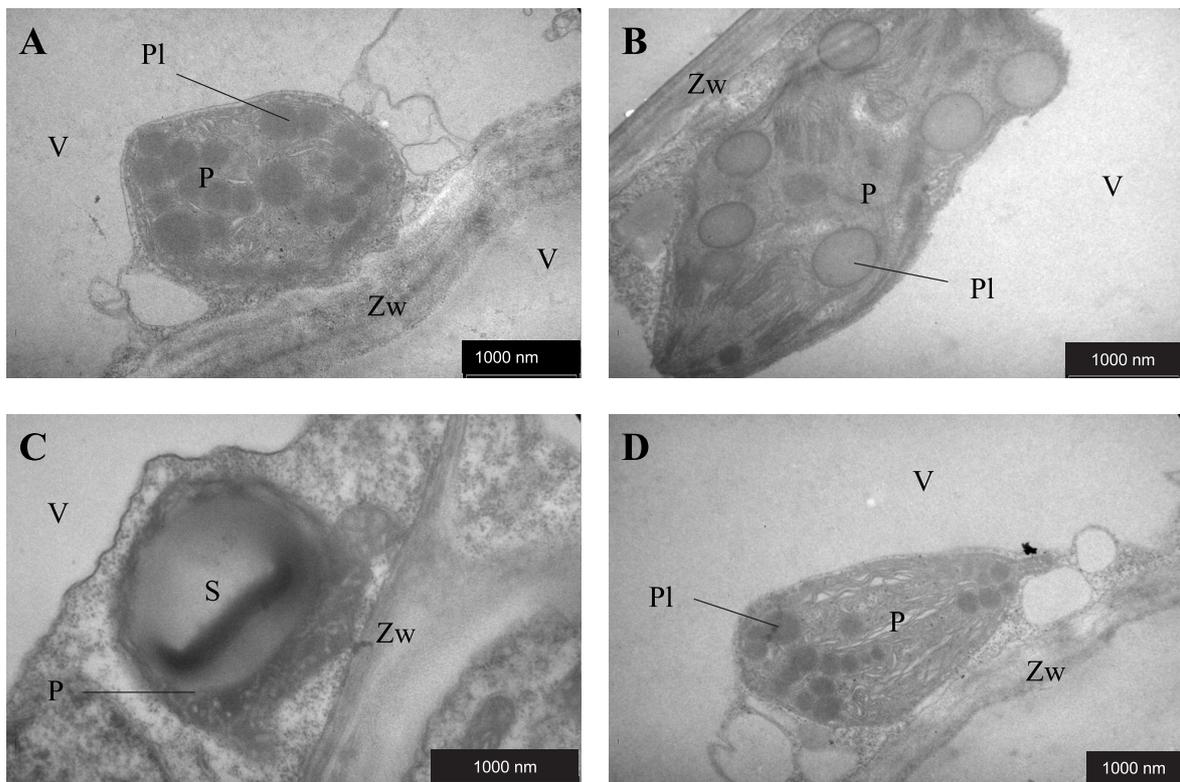


Abb. 28: Morphologische Analyse der Amyloplastenentwicklung. (A-D) Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Plastiden in unterirdischen Sprossen kurz vor Knollenansatz. P = Plastide, Pl = Plastoglobuli, V = Vakuole, Zw = Zellwand. Die mikroskopischen Aufnahmen wurden in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Mulisch in der Zentralen Mikroskopie der Universität Kiel erstellt.

der Spross im Dunkeln geerntet und vom Übergang ins Erdreich bis zum Knollenansatz in 3 ca. 2 cm lange Stücke unterteilt. Von den methanolischen Extrakten dieser Stücke wurden anschliessend die Spektren bei einer Wellenlänge von 700 nm bis 400 nm bestimmt. Lediglich in dem oberen Sprossabschnitt konnte Chlorophyll nachgewiesen werden, während in den unteren Sprossabschnitten kein Chlorophyll detektiert werden konnte. Das zeigt, daß die mittels TEM beobachteten Membranstapel unabhängig von Chlorophyll entstehen.

3.5 Transformation von Plastiden

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden neben den Analysen zur Genexpression in Amyloplasten Versuche angestellt, die Plastidentransformation von Kartoffelpflanzen zu etablieren. Zwar gibt es viele Berichte über die Transformation von Plastiden von Kulturpflanzen (DANIELL *et al.*, 2005), jedoch lag zu Beginn dieser Arbeit ein einzelner Bericht über die erfolgreiche Transformation der Plastiden von Kartoffelpflanzen vor (SIDOROV *et al.*, 1999). Der Grund für die bisher nicht routinemässige Transformation der Kartoffel könnte in der Wahl des Promotors in den Transformationonstrukten liegen.



Abb. 29: Sequenzvergleich des üblicherweise in der Plastidentransformation verwendeten Promotors aus Tabak (Nt16Spro) und des vollständigen Promotors aus Gerste (Hv16SNPpro). -10/-35 = Promotorelemente der PEP. YRT = Promotorelemente der NEP.

In den meisten bisher beschriebenen Transformationskassetten wird hauptsächlich der von der plastidenkodierte RNAP genutzte Promotor von *psbA* oder das Promotorelement des ribosomalen Operons für die PEP verwendet. Das ribosomale Operon besitzt allerdings neben diesem Promotor noch einen Promotor für die nukleär kodierte RNAP. Da nach einem von (MULLET, 1993) und (MALIGA, 1998) die NEP vornehmlich in Proplastiden aktiv ist, sollte durch Verwendung des vollständigen Promotors die Transformationseffizienz gesteigert und eine schnellere Regeneration von transgenen Pflanzen erreicht werden. Es wurden Konstrukte hergestellt, die das *aad*-Gen, das Spectinomycin-Resistenz vermittelt, unter Kontrolle des standardgemäß genutzten Minimalpromotors aus Tabak (Abb.

29 Nt16Spro) und des kompletten Promotors des ribosomalen Operons aus Gerste enthalten (Abb. 29 Hv16SNPpro). Zur Etablierung der Plastidentransformation wurden zunächst vergleichende Plastidentransformationen von Tabak durchgeführt. Durch diese Transformationen sollte gleichzeitig die Funktionalität des neuen Konstruktes Hv16SNPaadC getestet werden.

3.5.1 Vergleichende Plastidentransformation von Tabakpflanzen

In Abbildung 30 ist die Charakterisierung von Regeneraten nach einer Plastidentransformation von Tabak dargestellt. Bei dieser Transformation wurden je 40 Blätter mit dem Konstrukt pNtPaadC, das den Minimalpromotor Nt16Spro enthält, und dem Konstrukt HvNPaadC, das den vollständigen Promotor Hv16SNPpro enthält, biolistisch transformiert. Durch ‘Southern’-Blot-Analyse konnte gezeigt werden, daß 13 von 25 Regeneraten das Transformationskonstrukt enthalten, wobei die meisten der positiv getesteten Pflanzen noch Wildtypkopien aufweisen. Zwei der 27 Regenerate konnten wegen Pilzbefalls nicht mit in die ‘Southern’-Blot-Analysen aufgenommen werden. Es wurden jedoch unterstützend PCR-Analysen durchgeführt, in die auch die beiden in der ‘Southern-Blot’-Analyse nicht vertretenen Regenerate aufgenommen werden konnten. Diese beiden Regenerate tragen ebenfalls die Transformationskassette an der richtigen Position im Plastom, während die Linie Nt5-1/1 aufgrund dieser PCR-Analyse als nicht transgen einzustufen ist. Sie wurde in den weiteren Analysen daher nicht berücksichtigt.

Im weiteren Verlauf wurden die in Abbildung 30 charakterisierten Transformanten miteinander verglichen. Hierzu wurde das Auftreten der positiv getesteten Regenerate beider Ansätze mit den unterschiedlichen Konstrukten über die Zeit protokolliert. Bei dieser Art der Betrachtung zeigt sich, daß mit dem Konstrukt, das den vollständigen Promotor enthält, anscheinend eine schnellere Regeneration transplastomischer Pflanzen in Tabak möglich ist (Abb. 31). Zwar erscheint das erste Regenerat bei beiden Konstrukten nach 60 Tagen, jedoch entwickeln sich bei der Verwendung des Konstrukts, das den vollständigen Promotor trägt, alle weiteren transplastomischen Pflanzen innerhalb der nächsten 20 Tage (Abb. 31 Hv16SNPpro). Im Fall der Pflanzen, die mit dem Resistenzgen unter Kontrolle des Minimalpromotors transformiert wurden, stagniert zunächst die Anzahl positiver Re-

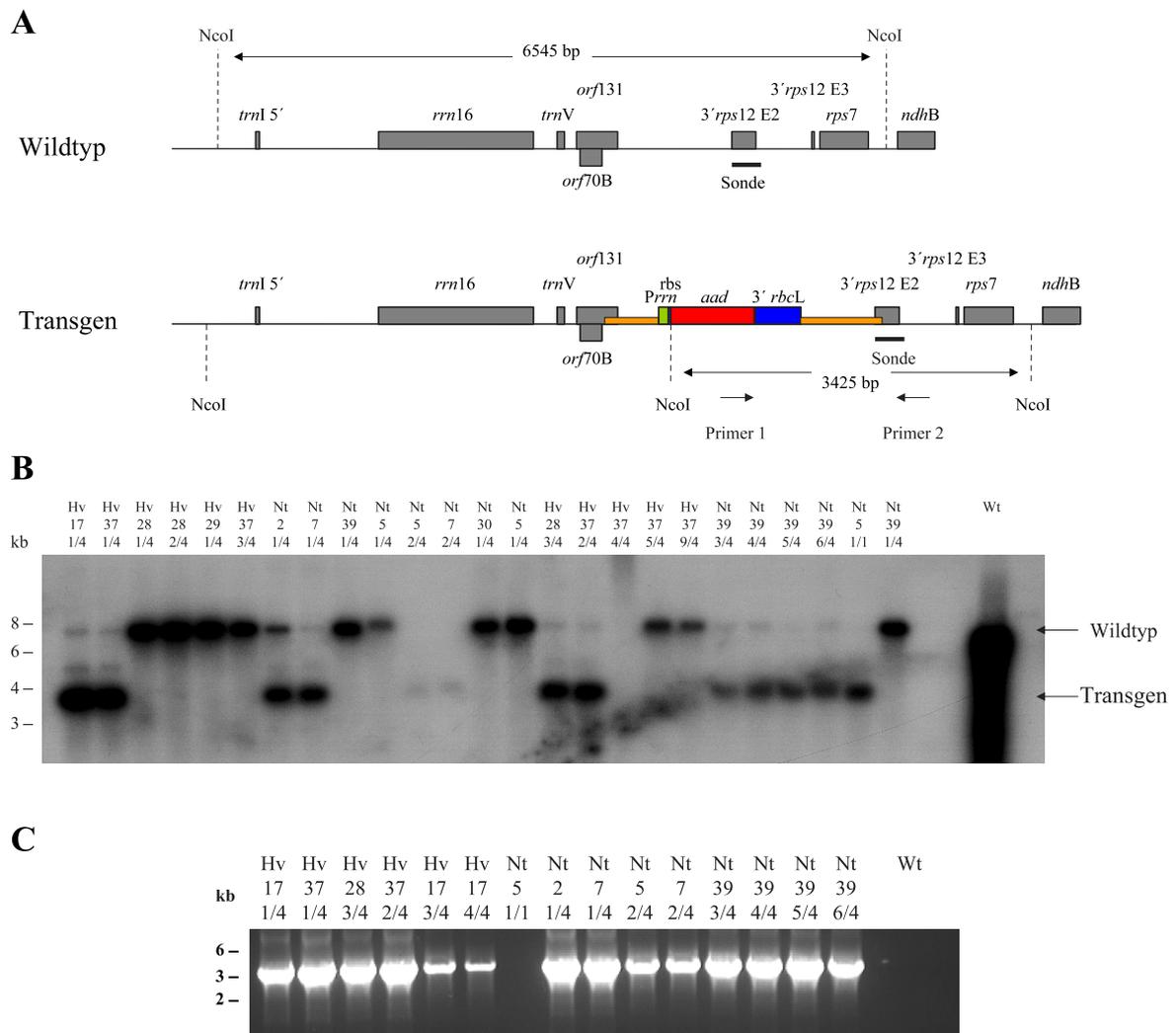


Abb. 30: Charakterisierung der positiven Regenerate nach Transformation mit den Plastidentransformationskonstrukten pNtPaadC und pHvNPaadC. (A) Schematische Darstellung der Integration des Konstrukts in die plastidäre DNA mit Angaben zur Länge der zu erwartenden DNA-Fragmente nach Verdau mit dem Restriktionsenzym *NcoI* und zur Lage der verwendeten Sonde (schwarzer Balken) und 'Primer' (Pfeile). (B) Autoradiogramm einer Hybridisierung von 2 μ g mit *NcoI* verdauter Gesamt-DNA von transformierten Regeneraten und dem Wildtyp mit einer spezifischen Sonde für *rps12*. (C) Gelelektrophoretisch aufgetrennte und mit Ethidiumbromid gefärbte PCR-Produkte.

generate bis zum Tag 90 (Abb. 31 Nt16Spro). Somit lässt sich tendenziell eine schnellere Regeneration von Pflanzen, die mit dem Resistenzgen unter der Kontrolle des vollständigen

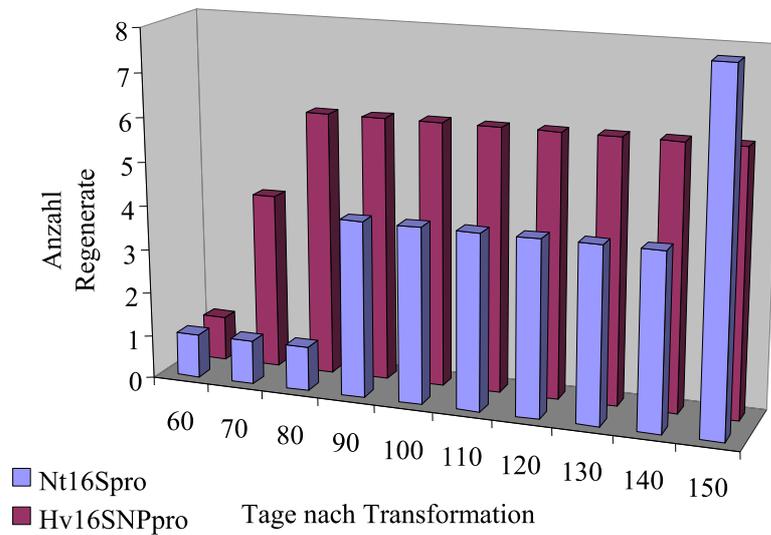


Abb. 31: Vergleichende Darstellung der Regenerationsgeschwindigkeit transgener Pflanzen nach Transformation mit Konstrukten, die das Resistenzgen unter Kontrolle verschiedener Promotoren, enthalten. Der Tag der Sproßbildung positiv getesteter Regnerate ist gegen die Zeit aufgetragen. Nt16Spro = Resistenzgen unter Kontrolle des ribosomalen Minimalpromotors, Hv16SNPpaad = Resistenzgen unter Kontrolle des vollständigen ribosomalen Promotors.

Promotor des ribosomalen Operons transformiert wurden, erkennen.

3.5.2 Transformation von Plastiden in Kartoffelpflanzen

Nachdem eine bessere Regeneration von transplastomischen Pflanzen bei Verwendung des vollständigen Promotors des ribosomalen Operons aus Gerste zu erwarten war, wurde das in Tabak getestete Konstrukt zur Transformation von Kartoffelpflanzen benutzt.

Bei der Plastidentransformation von Kartoffelpflanzen konnte keine Regeneration von transplastomischen Kartoffelpflanzen erreicht werden (Tab 6). Dies zeigt, daß nicht nur der in den Transformationskonstrukten verwendete Promotor für die Transformation von Kartoffelplastiden entscheidend ist. Daher wurden im Anschluß an die ersten Versuche mehrere Gewebekulturbedingungen getestet. Das bisher für Tabak verwendete Transformationsprotokoll stellte sich als ungeeignet für die Transformation von Kartoffeln heraus, da die transformierten Blattstücke auf dem für Tabak optimierten Medium sehr schnell austrock-

Tab. 6: Transformationen von Plastiden in Kartoffel mit dem Konstrukt pHvNPaadC (Promotor Hv16SNPpro). Die Transformation wurde entweder mit dem Protokoll für die Transformation von Tabak (1, s. 2.13.2) oder mit dem Kartoffeltransformationsprotokoll nach SIDOROV *et al.* (1999) (2, s. 2.13.3) durchgeführt

Transformation lfd. Nr.	Anzahl Regenerate	positive Regenerate	Protokoll	Bemerkung
1	-	-	1	Blattstücke sind vertrocknet
2	-	-	2	Blattstücke sind vital
3	2	-	2	Blattstücke sind vital

neten. Als besser geeignet zeigte sich das von SIDOROV *et al.* (1999) etablierte Medium. Mit diesem Protokoll konnte zwar eine Regeneration von Pflanzen erreicht werden, allerdings ergab die Charakterisierung dieser Pflanzen, daß sie die Transformationskassette nicht an der richtigen Position des Plastoms trugen und damit nicht als positiv eingestuft werden konnten.

4 Diskussion

4.1 Plastidenisolierung

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Genexpression in Plastiden setzen voraus, daß isolierte intakte Amyloplasten in entsprechenden Reaktionsgemischen inkubiert werden können. Daher war es zunächst notwendig, eine Methode zur Isolierung und Quantifizierung intakter Amyloplasten zu etablieren. Grundlage der hier zum Einsatz gekommenen Methode ist das von WISCHMANN *et al.* (1999) beschriebene Verfahren, das zur Analyse der Stärkesynthese etabliert wurde. Mit Hilfe dieser Methode konnten hinreichend intakte Amyloplasten für weiterführende Analysen isoliert werden. Die isolierten Amyloplasten erwiesen sich allerdings als sehr empfindlich. Bereits eine kurze Zentrifugation der isolierten Amyloplasten bei geringer Beschleunigung führte zu einem deutlichen Verlust an intakten Plastiden. Bei der Charakterisierung der isolierten Amyloplasten durch ‘Northern-Blot’-Analysen zeigte sich, daß die Fraktion deutlich mit Mitochondrien kontaminiert ist. Versuche zur Verringerung der Kontaminationen führten zum Verlust von intakten Amyloplasten. Da bei einem einzigen Waschschrift ein Drittel der isolierten Amyloplasten zerstört wurden (Abb. 8), wurde auf eine weitere Aufreinigung verzichtet und die nötige Spezifität der weiteren Untersuchungen durch Verwendung plastidenspezifischer Sonden bzw. durch die Verwendung mitochondrialer Kontrollen erreicht.

4.2 Genexpression in Amyloplasten der Kartoffelknolle

Alle Plastidentypen besitzen ihre eigene DNA, die über ca. 130 Gene verfügt. Die Expression dieser Gene unterliegt mannigfaltigen Kontrollmechanismen. Während in Chloroplasten bereits intensive Studien zur Transkription (KANAMARU und TANAKA, 2004; HESS und BÖRNER, 1999), zur Transkriptstabilität (MONDE *et al.*, 2000) und Translation (MANUELL *et al.*, 2004; ZERGES, 2000) durchgeführt wurden, gibt es keine detaillierte Analysen zur Genexpression in Amyloplasten. Da die Genexpression nicht nur auf Ebene der Transkription reguliert wird, sondern auch auf posttranskriptionaler Ebene, wurde neben der Transkription auch die Transkriptakkumulation und Translation untersucht.

4.2.1 Transkription in Amyloplasten

Die Transkription aller Bereiche des Plastidengenoms wurde durch ‘Run-on‘-Analysen mit isolierten Chloroplasten und Amyloplasten untersucht (DENG *et al.*, 1987; KRUPINSKA, 1992). Bei diesen Analysen wird den isolierten Organellen ein radioaktives Nukleotid angeboten, das von den RNAPs für die Synthese von *in vivo* initiierten Transkripten genutzt wird, wobei diese Transkripte markiert werden. Die bei der ‘Run-on‘-Transkription markierten Transkripte wurden anschließend mit plDNA-Fragmenten hybridisiert, die in ihrer Gesamtheit die komplette plastidäre DNA repräsentieren (SUGIURA *et al.*, 1986). Mit Hilfe dieser Analysen wurde im Rahmen dieser Arbeit gezeigt, daß verschiedene Bereiche des Genoms in Amyloplasten und Chloroplasten unterschiedlich stark transkribiert werden. Außerdem wurde festgestellt, daß die Transkription in Amyloplasten mit zunehmender Größe der Knolle abnimmt.

In Amyloplasten aus großen Knollen können nur noch die Transkripte des *psbA*-Gens und des ribosomalen Operons detektiert werden. Es ist davon auszugehen, daß diese Transkripte von der PEP synthetisiert werden, da *psbA* nur einen Promotor für diese RNAP besitzt, und in Amyloplasten aus großen Knollen nur der Transkriptionsstart dieser RNAP am ribosomalen Operon nachgewiesen werden konnte (Abb. 18). Die stark ausgeprägte Transkription des *psbA*-Gens, das für das D1-Protein des Photosystems II kodiert, war unerwartet, wurde allerdings bereits für Untersuchungen von Amyloplasten aus der Wurzel von Spinat (DENG und GRUISSEM, 1988) und aus Zellsuspensionen von Tabak (SAKAI *et al.*, 1992) sowie Bergahorn (NGERNPRASIRTSIRI *et al.*, 1988a) berichtet. Die Autoren stellen unterschiedliche Modelle für die Transkription in Amyloplasten auf. DENG und GRUISSEM (1988) untersuchten die Transkription mit Hilfe von ‘Run-on‘-Analysen. Sie gehen von einer konstitutiven Transkription aller plastidenkodierten Gene in allen Pflanzenorganen aus und machen posttranskriptionelle Prozesse für die Expression der Plastidengene verantwortlich. Dagegen führen SAKAI *et al.* (1992) nach Analyse der Transkription in isolierten Nukleoiden die erhöhte Transkription des *psbA*-Gens auf einen Abfall in der Aktivität und Spezifität der RNAP zurück. Zudem können Veränderungen in der Transkription auch durch strukturelle Veränderungen in den Nukleoiden verursacht werden (SAKAI *et al.*, 1992). Aus Untersuchungen an Amyloplasten aus Bergahorn wurden ähnliche Ergebnisse

erhalten wie in der vorliegenden Arbeit (NGERNPRASIRTSIRI *et al.*, 1988a). Während die Transkription der meisten Gene durch Methylierung der entsprechenden Loci abgestellt wird, bleibt sie bei dem nicht methylierten *psbA*-Gen erhalten (NGERNPRASIRTSIRI *et al.*, 1988a). Allerdings muß berücksichtigt werden, daß für die Transkriptionsanalysen kein transkriptionsaktiver Plastidenextrakt genutzt wurde, sondern die RNAP aus *Escherichia coli*. Es ist davon auszugehen, daß diese RNAP nur an Promotoren der PEP initiiert und daß somit NEP-abhängige Transkripte nicht synthetisiert werden konnten. Eine Übertragung dieser Ergebnisse auf die *in vivo* -Situation ist daher nur unter Vorbehalt möglich. In der zu Kartoffel nahe verwandten Art Tomate konnte eine zunehmende Methylierung der pDNA bei der Differenzierung von Chloroplasten zu Chromoplasten beobachtet werden (NGERNPRASIRTSIRI *et al.*, 1988b). Die Methylierung hat auch hier einen Einfluß auf die Transkription bestimmter Gene. Auch in diesem Fall wird das *psbA*-Gen nicht methyliert und die Transkription dieses Gens wenig beeinflusst (KOBAYASHI *et al.*, 1990). Es ist möglich, daß auch in Amyloplasten aus großen Kartoffelknollen die abnehmende Transkription auf eine zunehmende Methylierung der DNA zurückzuführen ist.

Gegenüber Amyloplasten großer Kartoffelknollen ist das Transkriptionsmuster in Amyloplasten aus kleinen Kartoffelknollen komplexer. In diesen Amyloplasten werden hauptsächlich Haushaltsgene, 10 Gene bzw. Operons für Photosynthese- und Stoffwechselwege sowie 12 Gene für offene Leserahmen transkribiert. Auffallend ist, daß in diesem Amyloplastentyp noch nahezu alle plastidenkodierte Gene, die in die Genexpression involviert sind, transkribiert werden. Auch bei der Chloroplastenentwicklung ist die Transkriptionsrate der Haushaltsgene in frühen Stadien am höchsten und nimmt mit zunehmendem Alter ab (KRUPINSKA, 1992; BAUMGARTNER *et al.*, 1993). Gleichzeitig nimmt mit zunehmender Reifung der Chloroplasten auch die Transkription von Photosynthesegenen zu, was in Amyloplasten, in denen die Transkription bis auf wenige Gene zum Erliegen kommt, nicht beobachtet werden kann.

Die Transkription in Plastiden ist abhängig von der Anwesenheit kernkodierter Transkriptionsfaktoren. Da in Amyloplasten aus großen Knollen nur noch die Transkriptionsaktivität der PEP nachgewiesen werden konnte, kommen als Faktoren aus dem Kern die σ -Faktoren in Frage, die diese RNAP zur Initiation benötigt. Es konnten bisher mehrere σ -Faktoren

aus verschiedenen Pflanzen isoliert werden (ALLISON, 2000). Die Transkripte der bisher in *A. thaliana* charakterisierten σ -Faktoren akkumulieren verstärkt in grünen Geweben und nach Lichtbehandlung der Pflanzen (TANAKA *et al.*, 1997; YAO und ALLISON, 1998; FUJIWARA *et al.*, 2000). Im Unterschied dazu ist der σ -Faktor ZmSig3 aus Mais, zu dem im grünen Gewebe vorhandenen ZmSig1 vor allem in nichtgrünen Geweben, wie Wurzeln, etiolierten Keimlingen und jungen Abschnitten der Pflanzen nachweisbar (LAHIRI und ALLISON, 2000). Der σ -Faktor ZmSig3 besitzt im Gegensatz zu den σ -Faktoren ZmSig1 und ZmSig2 keine 2.5-Region (LAHIRI *et al.*, 1999), die für die Erkennung der erweiterten -10-Box verantwortlich gemacht wird. Die erweiterte '-10-Box' des Promotors wurde erstmals von SATOH *et al.* (1999) für den *psbA*-Promotor in Plastiden beschrieben und wird für die lichtabhängige Aktivierung dieses Promotors verantwortlich gemacht. Im Zuge dieser Untersuchungen konnten die Autoren zusätzlich zwei Formen der PEP voneinander unterscheiden: eine Form, die in reifen Chloroplasten eine durch Kofaktoren vermittelte lichtabhängige Spezifität für die Promotoren der Gene *psbA* und *psbD* besitzt, und eine andere Form, die in unreifen Chloroplasten alle untersuchten Promotoren erkennt. Im Hinblick auf die unterschiedliche Expression der Gene für ZmSig3 und ZmSig1 diskutieren LAHIRI und ALLISON (2000) ein Modell, das von einer durch ZmSig3 vermittelten konstitutiven Transkription der PEP ausgeht, die mit der Reifung von Chloroplasten unter Vermittlung zusätzlicher σ -Faktoren immer spezifischer wird. Wenn man dieses Modell auf die Amyloplastenentwicklung überträgt, könnte man von einer durch die PEP vermittelten konstitutiven Transkription aller Gene mit PEP-Promotoren ausgehen, die während des Wachstums der Knolle abnimmt, weil keine zusätzlichen σ -Faktoren zur Verfügung gestellt werden und die Methylierung zunimmt. Nach dieser Hypothese verläuft die Amyloplastenentwicklung grundsätzlich nach ähnlichen bzw. gleichen Mechanismen wie die Chloroplastenentwicklung. Unterstützt wird dies durch die Ergebnisse zur Transkription der Gene in Amyloplasten aus kleinen Kartoffeln. In diesem Amyloplastentyp sind nicht nur PEP-abhängige Transkripte nachweisbar, sondern auch Transkripte, die auf eine NEP-abhängige Transkription zurückzuführen sind. So besitzen zum Beispiel die Transkriptionseinheiten *accD*, *rpoB-rpoC1-rpoC2* und *rpl33-rps18* jeweils nur einen Promotor für die NEP (HAJDUKIEWICZ *et al.*, 1997). Da in Amyloplasten aus kleinen Knollen eine schwache Transkription dieser Gene nachweisbar ist (Abb. 10), scheint in Amyloplasten aus kleinen Kartoffelknol-

len auch die NEP aktiv zu sein. Nach einem von MULLET (1993) und MALIGA (1998) aufgestellten Modell, das auch von EMANUEL *et al.* (2004) unterstützt wird, ist die NEP hauptsächlich in Proplastiden und frühen Stadien der Chloroplastenentwicklung aktiv und wird im Zuge der Entwicklung von der PEP ersetzt, die hauptsächlich Photosynthesegene transkribiert. Untersuchungen an *A. thaliana* haben ergeben, daß die NEP während der Chloroplastenentwicklung durch Interaktion mit der *trnA*-Glu in ihrer Transkriptionsaktivität gehemmt wird (HANAOKA *et al.*, 2005). Die Transkription dieser tRNA ist in *A. thaliana*-Mutanten ohne den σ -Faktor AtSig2 herabgesetzt (KANAMARU *et al.*, 2001). In den Amyloplasten der Kartoffelknollen steht auch tRNA-Glu zur Verfügung.

In Amyloplasten aus kleinen Knollen werden neben PEP-abhängigen auch NEP-abhängige Gene transkribiert, in Amyloplasten aus großen Knollen allerdings nur noch das PEP-abhängige *psbA*-Gen und das ribosomale Operon. Die Verschiebung zu einer PEP-abhängigen Transkription zeigt, daß die Transkription in Amyloplasten einer vergleichbaren Entwicklung unterliegt wie Chloroplasten. Während sich in reifen Chloroplasten die PEP als transkriptionsaktive RNAP durchsetzt, kommt die Transkription in reifen Amyloplasten zum Erliegen. Dies könnte an einer verstärkten Methylierung der pDNA oder/und an einem Mangel an Faktoren, die im Zellkern kodiert sind und nicht mehr in die Plastiden importiert werden, liegen.

4.2.2 Transkriptzusammensetzung und -stabilität in Amyloplasten

Die Konzentration eines bestimmten Transkripts ist zum einen abhängig von seiner Transkriptionsrate und zum anderen von seiner Stabilität (MONDE *et al.*, 2000). Die Stabilität plastidärer Transkripte variiert während der Plastidenentwicklung (KIM *et al.*, 1993). Dies kann damit zusammenhängen, daß die Photosyntheseaktivität der Chloroplasten bzw. der Redox-Zustand in den Plastiden von *Chlamydomonas reinhardtii* die Stabilität von Transkripten reguliert (MONDE *et al.*, 2000; SALVADOR und KLEIN, 1999).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß in Chloroplasten und in Amyloplasten die Regulation der Genexpression von der Transkription und vom Abbau von Transkripten abhängt. Obwohl in Chloroplasten nahezu alle Gene transkribiert werden (Abb. 10), ak-

kumulieren nur wenige Transkripte (Abb.19). Dies spricht dafür, daß die Transkripte, die in Chloroplasten nicht akkumulieren, instabil sind. Beim Vergleich der in Chloroplasten und Amyloplasten akkumulierten Transkripte sind nur wenige Unterschiede festzustellen. Auch die Transkriptmuster von Amyloplasten aus kleinen und aus großen Knollen weisen keine wesentlichen Unterschiede auf. Erstaunlicherweise ist die relative Transkriptionsrate der in Amyloplasten akkumulierenden Transkripte gering. Das weist darauf hin, daß die Transkripte, die in Amyloplasten akkumulieren, gegenüber von Transkripten in Chloroplasten eine deutlich erhöhte Stabilität aufweisen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte allerdings nicht geklärt werden auf welche Weise die Stabilisierung dieser RNA in Amyloplasten erzielt wird. Studien an *Chlamydomonas reinhardtii* und Chloroplasten Höherer Pflanzen zeigen, daß die Transkriptstabilisierung von kernkodierten Komponenten abhängt. So konnten aus Chloroplasten von *Chlamydomonas reinhardtii* für das auch in Amyloplasten akkumulierende *psbD*-Transkript zwei kernkodierte Faktoren, das 47kDa-Protein und das Nac2-Protein, isoliert werden. Diese Proteine binden spezifisch an das *psbD*-Transkript und erhöhen dadurch seine Stabilität (BOUDREAU *et al.*, 2000; NICKELSEN *et al.*, 1994). Ähnliche Beobachtungen konnten auch an Höheren Pflanzen wie *A. thaliana* gemacht werden. So zeigen die Transkripte der Gene *psbB*, *psbD*, *ndhC* und *ndhH* in der *Arabidopsis*-Mutante *hcf109* eine geringe Stabilität (MEURER *et al.*, 1996). Die Transkriptionsrate dieser Gene ist bei Mutante und Wildtyp eher gleich, während die genannten Transkripte in der RNA-Fraktion der Mutante kaum nachweisbar sind. Dies deutet auf einen schnelleren Abbau der Transkripte hin. Diese und weitere Mutanten zeigen, daß die Stabilität der Transkripte in Plastiden durch spezifische Kernfaktoren kontrolliert wird. Es ist anzunehmen, daß auch die in Amyloplasten akkumulierenden Transkripte aktiv stabilisiert worden sind.

Neben Transkripten, die in Amyloplasten und Chloroplasten zu gleichen stöchiometrischen Verhältnissen akkumulieren, sind einige Transkripte in Amyloplasten relativ stärker vertreten als in Chloroplasten (Abb. 19 und 22).

Eines dieser Transkripte ist das Transkript des 3' *rps12*-Gens. Das reife *rps12*-Transkript entsteht durch *trans*-Spleißen von zwei Transkripten, deren Gene mehrere Kilobasen voneinander entfernt kodiert sind. Da aber das 5' *rps12*-Transkript in Amyloplasten nicht stärker akkumuliert als in Chloroplasten (Abb. 19 pTBa1), ist davon auszugehen, daß

die auf dem gleichen Restriktionsfragment wie das 3' *rps12*-Transkript liegende tRNA-I in Amyloplasten stabiler ist als in Chloroplasten (Abb. 22).

Ein ähnlicher Fall liegt bei der tRNA-R vor, die mit einem Teil des ribosomalen Operons von dem 941 bp großen Fragment des PCR-Produkts repräsentiert wird (Abb. 19). Somit scheint die tRNA-R in Amyloplasten stärker stabilisiert zu sein als in Chloroplasten. Allerdings kommt noch eine weitere Möglichkeit in Betracht. Die Markierung der Transkripte erfolgte durch eine Ligation am 3'-Ende, wodurch Primärtranskripte und prozessierte Transkripte gleichermaßen markiert werden. Die Intensität der Hybridisierungssignale aller Fragmente, die das ribosomale Operon repräsentieren, ist in Amyloplasten deutlich gleichförmiger als in Chloroplasten (Abb. 22). Daher könnte die scheinbar höhere Stabilität der tRNA-I und tRNA-R in Amyloplasten auch auf eine nicht vollständige Prozessierung der ribosomalen RNAs zurückzuführen sein. In der aktuellen Literatur wurde die *Arabidopsis*-Mutante *dal1-2* charakterisiert, die aufgrund einer Transposon-Insertion im *dal1-2*-Gen das ribosomale Operon nicht mehr korrekt prozessiert (BISANZ *et al.*, 2003). Interessanterweise arretieren die Chloroplasten dieser Mutante früh in der Entwicklung und weisen ähnliche Membranstrukturen auf wie die Plastiden in Kartoffelsprossen (Abb. 28). Transkripte, die in Amyloplasten schwächer akkumulieren als in Chloroplasten, sind die tRNAs R-UCU, G-UCC, L-UAA, L-UAG, L-CAA, F-GAA, I-CAU, I-GAU, K-UUU, N-GUU und P-UGG. Mit den tRNAs L-UAA, L-UAG, L-CAA, I-CAU und I-GAU sind alle tRNAs betroffen, die das Antikodon von Leucin und Lysin besitzen. Da alle durch die plDNA kodierten Proteine wenigstens eine dieser Aminosäuren enthalten, sollte in Amyloplasten die Translation von Proteinen unmöglich sein. Man sollte bei dieser Betrachtung allerdings nicht außer acht lassen, daß möglicherweise tRNAs aus dem Cytosol in die Plastiden importiert werden können, wie das für Mitochondrien beschrieben ist (SUGITA und SUGIURA, 1996). Die auf dem Plastom kodierten 30 tRNAs sind in der Lage, durch eine erweiterte 'Wobble'-Antikodon-Erkennung mit allen Kodonen zu hybridisieren. Allerdings hat die Sequenzierung des Plastidengenoms der parasitischen Pflanze *Epifagus virginiana* ergeben, daß in dem reduzierten Plastom dieser Pflanzen nur noch 13 tRNAs kodiert sind, aber mRNAs mit allen Kodonen in den Plastiden translatiert werden (MORDEN *et al.*, 1991). Diese Beobachtung spricht für einen Import von tRNAs aus dem Cytosol und somit dafür, daß Plastiden eventuell nicht auf die in Plastiden kodierten tRNAs angewiesen sind.

Neben den genannten tRNAs fehlen die Transkripte der α -, I-, III- und IV- Untereinheit der ATPase in der Fraktion akkumulierter RNA aus Amyloplasten. Da die betroffenen Gene in Amyloplasten aus kleinen Knollen transkribiert werden (Abb. 12), ist anzunehmen, daß diese Transkripte in Amyloplasten instabil sind. In *Chlamydomonas reinhardtii* wurden Analysen zur Stabilität der mRNA von *atpA*, dem Transkript der α -Untereinheit der ATPase, durchgeführt. Diese zeigten, daß ein im Kern kodiertes Protein entscheidend für die Stabilität des Transkripts ist. Allerdings hat die Mutation dieses Gens und die dadurch verringerte Stabilität des Transkriptes nur einen geringen Einfluß auf die Biosynthese dieses Proteins (DRAPIER *et al.*, 1992). Diese Beobachtung konnte durch Untersuchungen von EBERHARD *et al.* (2002) bestätigt werden, die zeigten, daß die Translationseffizienz nicht mit der Transkriptabundanz korreliert. Daher könnte dieses Protein in Amyloplasten aus kleinen Knollen durchaus noch translatiert werden und in Amyloplasten aus großen Knollen noch seine Funktion erfüllen.

Auffallend ist, daß in Amyloplasten neben sehr vielen tRNAs, auch Transkripte einiger Photosynthesegene, darunter die Transkripte für das D1- und D2-Proteins im Reaktionszentrum des Photosystem II, und Transkripte von acht offenen Leserahmen akkumulieren. Die Funktion der offenen Leserahmen *ycf3*, *ycf6* und *ycf9* konnte kürzlich gezeigt werden. So ist das vom Gen *ycf3* kodierte Protein verantwortlich für die korrekte Assemblierung von Photosystem I. Dabei interagiert das zugehörige Protein direkt mit den Untereinheiten PsaA und PsaD und wird infolgedessen als Chaperon diskutiert (NAVER und ROCHAIX, 2001). Das Genprodukt von *ycf6* ist ein kleines Protein, das ebenfalls als Kofaktor für den Zusammenbau eines Photosynthesekomplexes, dem Cytochrom- b_6f -Komplex, fungiert (HAGER *et al.*, 1999). Das Produkt des offenen Leserahmen *ycf9*, PsaZ, ist an der Interaktion zwischen Photosystem II und den Antennenkomplexen beteiligt (SWIATEK *et al.*, 2001). Die Tatsache, daß in Amyloplasten die Transkripte von *ycf3* und *ycf6*, deren zugehörige Proteine in der Assemblierung von Photosynthesekomplexen beteiligt sind, deutet darauf hin, daß diese RNAs für eine schnelle Umdifferenzierung von Amyloplasten in Chloroplasten bereitgehalten werden.

4.2.3 Translation in Amyloplasten

Die Translation erfolgt in Plastiden durch die 70S-Ribosomen. Voraussetzung für die Synthese von Proteinen ist daher das Vorhandensein von ribosomalen Proteinen in Amyloplasten. Mit einem Antikörper gegen die 30S ribosomale Untereinheit konnte in Chloroplasten als auch in Amyloplasten ein Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 18kDa detektiert werden. Da der Antikörper gegen die gesamte 30S-ribosomale Untereinheit gerichtet ist, sollte er eigentlich mehrere Proteine immunomarkieren (FEIERABEND *et al.*, 1988). Allerdings wurde auch in den Untersuchungen von FEIERABEND *et al.* (1988) nach eindimensionaler Auftrennung eine Proteinbande des gleichen Molekulargewichts wie in den vorliegenden Untersuchungen nachgewiesen. Durch zweidimensionale Auftrennung wurde gezeigt, daß diese Proteinbande aus mehreren Proteinen besteht (FEIERABEND *et al.*, 1988). Eine Voraussetzung für die Bildung funktionsfähiger Ribosomen ist, daß Transkripte ribosomaler Proteine korrekt prozessiert werden. Am Beispiel des *rps12*-Transkripte wurden in dieser Arbeit Untersuchungen zur Prozessierung des *rps12*-Transkripts durchgeführt. Das *rps12*-Transkript wird von zwei unterschiedlichen Transkriptionsheiten kodiert und ist in drei Exone unterteilt. Das reife Transkript entsteht durch *cis*-Spleißen und *trans*-Spleißen. In Untersuchungen von HÜBSCHMANN *et al.* (1996) konnte gezeigt werden, daß das *trans*-Spleißen dieses Transkripts in ribosomendefizienter Gerste beeinträchtigt ist. Zudem ist eine Synthese des kodierten Proteins erst möglich, wenn das Transkript korrekt prozessiert ist. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß auch in Amyloplasten dieses Spleißen erfolgt.

Der immunologische Nachweis ribosomaler Proteine als auch die Ergebnisse zur Prozessierung des *rps12*-Transkript weisen auf das Vorhandensein von Ribosomen hin. Zudem zeigen Arbeiten mit plastidentransformierten Kartoffelpflanzen, daß das Fremdprotein in geringen Mengen in Kartoffelknollen nachzuweisen ist (SIDOROV *et al.*, 1999; NGUYEN *et al.*, 2005). Somit sollte zu erwarten sein, daß in Amyloplasten eine Proteinbiosynthese erfolgt.

Versuche zu direkter Messung der Translationsaktivität durch eine *in organello*-Translation mit markierten Aminosäuren schlugen fehl. Daher wurde der Nachweis geführt, daß in Amyloplasten Polysomen assemblieren (Abb. 25). Allerdings ist die Ausbildung von Polysomen lediglich ein Nachweis dafür, daß Ribosomen an Transkripten initiiert haben. So konnte

am Beispiel des *psbA*-Transkripts gezeigt werden, daß es in etiolierten Gerstepflanzen mit Polysomen assoziiert ist, aber nicht elongiert wird (KLEIN *et al.*, 1988). In einer späteren Arbeit konnten spezifische Arretierungsstellen im *psbA*-Transkript identifiziert werden (KIM *et al.*, 1991), und in Spinatchloroplasten hängt die Elongation des *psbA*-Transkripts vom Redox-Zustand und dem Protonengradient über die Thylakoidmembran ab (ZHANG *et al.*, 2000). Diese Befunde zeigen, daß es neben einer Kontrolle der Translationsinitiation auch eine Kontrolle auf Ebene der Elongation gibt. Daher ist die Ausbildung von Polysomen in Amyloplasten lediglich ein Nachweis dafür, daß in Amyloplasten Transkripte mit Ribosomen assoziiert sind.

Einen Hinweis darauf, daß in Amyloplasten überhaupt Elongation stattfindet, gibt die Zusammensetzung der polysomalen RNA-Fraktion (Abb. 27). Beim Vergleich der mit Polysomen assoziierten Transkripte in Amyloplasten und in Chloroplasten zeigt sich, daß grundsätzlich alle mRNAs, die in Chloroplasten mit Polysomen assoziiert sind auch in Amyloplasten mit Ribosomen beladen sind. Allerdings ist in Amyloplasten der Anteil ribosomaler RNA in der mit Polysomen assoziierten RNA-Fraktion im Vergleich zu Chloroplasten deutlich erhöht. Daraus ist zu schließen, daß in Amyloplasten sehr wenige Transkripte mit vielen Ribosomen besetzt sind und daß der größte Teil der in Amyloplasten vorhandenen Transkripte nicht mit Ribosomen assoziiert ist.

Die Assoziation von Ribosomen mit wenigen mRNAs deutet darauf hin, daß in Amyloplasten die Ribosomen auf den RNAs arretiert sind. Diese Vermutung wird unterstützt durch die Beobachtung, daß sich unter den mit Polysomen assoziierten Transkripten auch das des Gens *psbA* befindet und die Elongation dieses Proteins vielen Kontrollmechanismen unterliegt (ZHANG *et al.*, 2000). Da viele Transkripte nicht mit Ribosomen besetzt sind, ist anzunehmen, daß in Amyloplasten keine Neuintiation der Translation erfolgt. Daraus ist weiterhin zu schließen, daß kein durch die pDNA kodiertes Protein eine Funktion in Amyloplasten besitzt.

4.2.4 Plastidendifferenzierung

Die Analysen zur Genexpression in Amyloplasten zeigen, daß in diesem Plastidentyp kein Gen bevorzugt exprimiert wird und daß die Transkription wie in Chloroplasten entwick-

lungsabhängig reguliert ist (Kap. 4.2.1). Die Transkription nimmt insgesamt während der Knollenentwicklung ab und in Amyloplasten unterschiedlich großer Knollen sind die gleichen Transkripte nachweisbar. Unter den in Amyloplasten akkumulierten Transkripten befinden sich unter anderem die Transkripte für das D1-Protein des Photosystems II, die Untereinheit A des Reaktionszentrums von Photosystem I, und die *ycf3*- und *ycf6*-Transkripte, deren Produkte als Kofaktoren für die korrekte Assemblierung von Photosynthesekomplexen diskutiert werden (NAVER und ROCHAIX, 2001; HAGER *et al.*, 1999). Diesen Transkripten ist gemein, daß sie Proteine kodieren, die zu Beginn der Ausbildung des Photosyntheseapparates benötigt werden. Es stellt sich daher die Frage, ob die Amyloplasten der Kartoffelknolle tatsächlich aus Proplastiden oder vielmehr aus Etioplasten bzw. einem frühen Chloroplastenstadium entstehen.

Die Analysen von Ultradünnschnitten von Sprossen am Übergang zur Knolle ergaben, daß in diesen Sproßabschnitten weder Proplastiden noch Etioplasten vorliegen. Die Plastiden in diesen Sproßabschnitten sind vielmehr mit vesikulären und tubulären Membranen gefüllt, enthalten aber kein Chlorophyll. Interessanterweise sind ähnliche Plastidentypen für die parasitische Blütenpflanze *Cuscuta odorata* beschrieben worden (VAN DER KOOIJ *et al.*, 2000). Auch die in der Wurzel der Bohne nachgewiesenen Amöboidoplasten weisen ähnliche interne Strukturen auf (WHATLEY, 1983). Die Amöboidoplasten entwickeln sich über Prägranalplastiden, in denen der Aufbau der Thylakoidmembranen erfolgt, zu Chloroplasten (WHATLEY, 1977, 1978). Diese Beobachtungen weisen darauf hin, daß Proplastiden abgeleitete Plastiden und daß die verschiedenen Typen der Plastiden sich von der Chloroplastenbiogenese aus differenzieren (Abb. 32).

Unterstützung findet dieses Modell durch die Evolution der Plastiden. Plastiden sind durch die Endosymbiose eines photosynthetisch aktiven Cyanobakteriums entstanden (MC FADDEN, 1999). Aus dieser Tatsache ergibt sich, daß die üblicherweise als Vorläufer für alle Plastidentypen gehandelten Proplastiden genauso wie beispielsweise die Amyloplasten abgeleitete Formen der ursprünglichen photosynthetisch aktiven Chloroplasten sind. Interessanterweise gibt es auch in Heterocysten von filamentösen Cyanobakterien, z.B. *Mastigocladus laminosus*, ähnlich membranöse Strukturen im Cytoplasma wie in den Plastiden der Kartoffelsprosse (NIERZWICK-BAUER *et al.*, 1984), woraus zu vermuten ist, daß eine

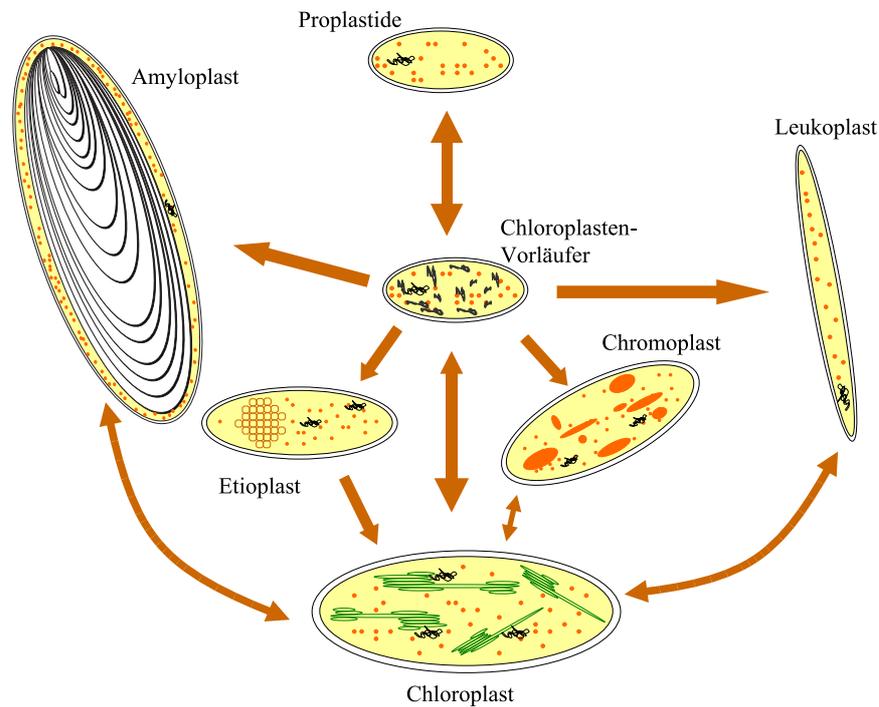


Abb. 32: Vorschlag eines modifizierten Modells zur Differenzierung von Plastiden.

ähnliche Differenzierung bereits im Endosymbionten möglich war.

Die Proplastiden wären in dem vorgeschlagenen Modell spezielle abgeleitete Plastiden ohne ausgeprägte innere Membranstrukturen, die in meristematischen Zellen vorkommen und aufgrund ihres einfachen Aufbaus einfach und schnell zu teilen sind. Nach diesem Modell entwickeln sich alle anderen Plastidentypen über einen Chloroplastenvorläufer, der zunächst innere Membranstrukturen ausbildet und sich dann in die entsprechenden Plastidentypen umdifferenziert. Allerdings gibt es auch die Möglichkeit zur Konversion ausdifferenzierter Plastidentypen, wie beispielsweise bei den Kappenplastiden von *Elatostema repens*.

Zur Überprüfung des vorgeschlagenen Modells zu Plastidendifferenzierung sind weitere ultrastrukturelle Untersuchungen zur Differenzierung von Amyloplasten, Chromoplasten und Leukoplasten nötig.

4.3 Plastidentransformation

Die bisher verwendeten Plastidentransformationskonstrukte sind für eine hohe Expression des Fremdproteins in Chloroplasten geeignet. Mit den Untersuchungen zur Genexpression in Amyloplasten sollten die Voraussetzungen für eine effiziente Expression von Genen in Amyloplasten geschaffen werden. Es war vorgesehen regulatorische Elemente von in Amyloplasten stark exprimierten Genen für die Konstruktion alternativer Transformationskassetten zu nutzen. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigten allerdings, daß die Transkriptionsrate aller Gene in Amyloplasten mit zunehmender Größe der Knollen stark abnimmt und daß eine effiziente Translation in Frage gestellt werden muß. Daher sind die Amyloplasten der Kartoffel nicht für eine effiziente Expression von in das Plastidengenom integrierten Fremdgenen geeignet.

Parallel zu den Untersuchungen zur Genexpression in Amyloplasten wurden dennoch Versuche unternommen, die Plastidentransformation von Kartoffelpflanzen zu etablieren. Zu Beginn dieser Arbeit lag nur ein Bericht über eine erfolgreiche Plastidentransformation von Kartoffelpflanzen vor (SIDOROV *et al.*, 1999). Bei diesen Versuchen wurden nach 46 Beschüssen mit einem Transformationskonstrukt, das das Selektionsgen unter der Kontrolle des Minimalpromotors des ribosomalen Operons trägt, und nach 104 Beschüssen mit einem Konstrukt, das den Promotor des *psbA*-Gens enthält, jeweils drei transplastomische Pflanzen erhalten. In einer neuen Untersuchung wurden nach 208 Beschüssen mit Konstrukten, die ebenfalls das Selektionsgen unter der Kontrolle des Minimalpromotors des ribosomalen Operons tragen, 14 transplastomische Linien erhalten (NGUYEN *et al.*, 2005). Ein möglicher Grund für diese schlechte Transformationseffizienz könnte darin liegen, daß der verwendete Promotor nicht geeignet ist. Möglicherweise ist für die Regeneration von Kartoffelpflanzen der vollständige Promotor des ribosomalen Operons, der neben dem üblicherweise verwendeten PEP-Promotor auch die Elemente des NEP-Promotors enthält, notwendig, da die NEP nach einem MULLET (1993) und MALIGA (1998) aufgestellten Modell, früh in der Chloroplastenentwicklung aktiv ist. Um diese Möglichkeit zu testen, wurden im Rahmen dieser Arbeit Vektoren, die das Resistenzgen einmal unter der Kontrolle des üblicherweise verwendeten Minimalpromotors und ein anderes Mal unter der Kontrolle des vollständigen Promotors des ribosomalen Operons tragen, vergleichend transformiert.

Zunächst wurden die beiden Promotoren vergleichend zur Transformation von Tabakpflanzen mit den Vektoren pNtPaadC und pHv16SNPaad eingesetzt. Die Transformationen ergaben, daß eine tendenziell schnellere Regeneration der Pflanzen erfolgt, die mit dem Vektor pHv16SNPaad transformiert wurden (Abb. 31). Da die beiden verglichenen Vektoren bis auf den Promotor identisch sind, ist davon auszugehen, daß die schnellere Regeneration transplastomischer Pflanzen auf den vollständigen Promotor des ribosomalen Operon zurückzuführen ist. Der Vektor mit dem vollständigen Promotor wurde daher für Transformationsversuche an Kartoffelpflanzen eingesetzt.

Für die Transformationen von Kartoffelpflanzen wurde zunächst das für Tabakpflanzen etablierte Protokoll verwendet. Es zeigte sich jedoch, daß unter diesen Bedingungen die Kartoffel explantate sehr schnell austrockneten. Aus diesem Grund wurde im weiteren Verlauf dieser Arbeit das von SIDOROV *et al.* (1999) etablierte Protokoll verwendet, mit dem tendenziell langlebigere Explantate erhalten wurden. Es konnten jedoch weder mit dem für Tabak etablierten Protokoll noch mit dem Protokoll nach SIDOROV *et al.* (1999) transplastomische Kartoffelpflanzen erzeugt werden.

Aus den Ansätzen zur Transformation der Kartoffelpflanzen ergaben sich lediglich zwei gegen Spectinomycin resistente Sprosse, die das Transformationskonstrukt aber nicht an der dafür vorgesehenen Stelle trugen. Die Spectinomycinresistenz dieser Pflanzen kann auf zwei Ursachen zurückzuführen sein: Entweder kann eine Transformation des Zellkerns erfolgt sein, bei der die Transformationskassette zufällig in der Nähe eines aktiven Gens inseriert wurde, oder eine spontane Punktmutation der 16S ribosomalen RNA hat zur Resistenz gegenüber diesem Antibiotikum geführt. Ein hoher Anteil an nicht transplastomischen Pflanzen wurde auch in anderen Untersuchungen zur Plastidentransformation beobachtet (SIDOROV *et al.*, 1999; NGUYEN *et al.*, 2005).

4.4 Schlußfolgerung

Im Hinblick auf die Verwendung der Plastidentransformation zur Erzielung einer hohen und weitgehend gewebespezifischen Expression eines Fremdproteins in den Knollen der Kartoffel ergibt sich aus den erhaltenen Ergebnissen zur Genexpression in Amyloplasten, die Frage, inwieweit dieser Ansatz überhaupt sinnvoll ist.

. Die Transkription nimmt in Amyloplasten mit der Knollenentwicklung ab und die Analysen zur Translation zeigen, daß in Amyloplasten keine hohe Translationseffizienz zu erwarten ist. Weiterhin haben die Untersuchungen gezeigt, daß in Amyloplasten kein plastidenkodiertes Protein bevorzugt exprimiert wird und daher mit Hilfe der Plastidentransformation keine gewebespezifische Expression in der Kartoffelknolle erzielbar ist. Daher ist die Plastidentransformation von Kartoffelpflanzen als eine für die industrielle Nutzung uninteressante Technik einzustufen. Für die hohe und effiziente Expression von Transgenen in transplastomischen Nutzpflanzen kommen nur solche Gewebe in Frage, in denen die Chloroplasten als Biofabrik genutzt werden können. Eine solche Pflanze könnte z.B. der Kopfsalat darstellen, der auch durch Plastidentransformation genetisch manipuliert werden kann (LELIVELT *et al.*, 2005). Weitere Zielpflanzen für die Plastidentransformation stellen Pflanzen dar, in denen die Chromoplasten zur Expression von Fremdgenen genutzt werden. So konnten RUF *et al.* (2001) zeigen, daß das Fremdprotein in transplastomischen Tomatenpflanzen in reifen Früchten im Vergleich zu Blättern zu 50% akkumuliert. Die Autoren erklären das hohe Expressionsniveau in Chromoplasten damit, daß die Tomatenfrucht vor der Initiation der Fruchtreife aus photosynthetisch aktiven Gewebe besteht und daß eine aktive Genexpression während der Konversion des Chloroplasten zum Chromoplasten erhalten bleibt. Dies führt allerdings zu dem Schluß, daß auch in diesem Plastidentyp eine für Chloroplasten optimierte Transformationskassette zum Einsatz kommen muß und somit keine gewebespezifische Expression des Transgens in den Tomatenfrüchten erreicht werden kann.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Genexpression in Amyloplasten der Kartoffelknolle auf den Ebenen der Transkription, Transkriptzusammensetzung und Translation analysiert. Auf der Grundlage der Ergebnisse sollten Strategien zur Erzielung einer hohen und möglichst gewebespezifischen Expression von Fremdgenen in Kartoffelpflanzen mittels Plastidentransformation entwickelt werden. Parallel zu den Untersuchungen zur Genexpression wurde versucht, die Effizienz der Plastidentransformation in Kartoffelpflanzen zu erhöhen.

Mit 'Run-On'-Transkriptionsanalysen wurde gezeigt, daß die Transkriptionsaktivität der Amyloplasten während der Knollenentwicklung stark abnimmt und daß in Amyloplasten aus kleinen Knollen im Unterschied zu Chloroplasten hauptsächlich Haushaltsgene transkribiert werden. Durch Hybridisierung mit 'Run-On'-Transkripten und 'Primer-Extension'-Analysen konnte gezeigt werden, daß in den ausdifferenzierten Amyloplasten hauptsächlich die plastidär kodierte RNA-Polymerase (PEP) aktiv ist, während in Amyloplasten aus jungen Knollen neben der PEP zusätzlich die kernkodierte RNA-Polymerase (NEP) aktiv ist.

Untersuchungen zur Zusammensetzung der RNA in Chloroplasten und Amyloplasten ergaben, daß in beiden Plastidentypen nahezu die gleichen RNA-Spezies akkumulieren und daß die RNA-Zusammensetzung während der Knollenentwicklung gleich bleibt. Im Hinblick auf die niedrige Transkriptionsrate der betroffenen Gene ist anzunehmen, daß die akkumulierende RNA in Amyloplasten eine sehr hohe Stabilität aufweist.

Da die für ribosomale Proteine spezifischen Transkripte in Amyloplasten korrekt gespleißt werden, ist anzunehmen, daß sie translatiert werden können. Durch immunologische Untersuchungen konnten in der Tat ribosomale Proteine in Amyloplasten nachgewiesen werden. Durch den Nachweis von Polysomen konnte zudem gezeigt werden, daß die in Amyloplasten vorhandenen Ribosomen mit Transkripten assoziiert sind. Eine Analyse der mit Polysomen assoziierten mRNAs ergab, daß nahezu alle in der nichtpolysomalen Fraktion vertretenen Transkripte auch in der polysomalen Fraktion zu finden sind. Bei einem Vergleich der polysomalen RNA aus Amyloplasten und der aus Chloroplasten wurde allerdings deutlich, daß in Amyloplasten neben der ribosomalen RNA nur geringe Mengen mRNA zu finden sind. Dies könnte bedeuten, daß die Ribosomen auf den Transkripten arretiert sind. Da in

Amyloplasten kein Transkript in der polysomalen RNA besonders angereichert ist, ist nicht anzunehmen, daß es von der pDNA kodierte Proteine mit einer spezifischen Funktion in Amyloplasten gibt.

Die Ergebnisse zur Genexpression in Amyloplasten und zur Ultrastruktur von Plastiden aus unterirdischen Sprossen der Kartoffel, lassen den Schluß zu, daß in Kartoffelpflanzen die Entwicklung der Amyloplasten nicht von Proplastiden ausgeht, sondern von einem jungen Chloroplastenstadium.

Vor der Etablierung eines effizienten Protokolls zur Plastidentransformation mit Kartoffelpflanzen wurden zunächst vergleichende Transformationen von Tabakpflanzen mit zwei verschiedenen Transformationskassetten durchgeführt. Im ersten Fall steht das Resistenzgen unter der Kontrolle des üblicherweise in der Plastidentransformation genutzten Minimalpromotors des ribosomalen Operons und im zweiten Fall unter Kontrolle des gesamten Promotors dieses Operons. Die Untersuchungen an Tabak zeigten, daß bei Nutzung des vollständigen Promotors eine schnellere Regeneration transplastomischer Pflanzen möglich ist. Die Transformation von Kartoffelpflanzen mit diesem Konstrukt führten allerdings nicht zu transplastomischen Pflanzen. Aufgrund der Ergebnisse zur Genexpression in Amyloplasten, die offensichtlich nicht zur Synthese von großen Mengen eines Proteins in der Lage sind, erscheint es nicht sinnvoll, weitere Ansätze zur Transformation von Kartoffelpflanzen durchzuführen.

6 Summary

Plastids are ubiquitous organelles which are present in all plant cells and which possess their own genetic system.

In the present study, gene expression in amyloplasts of potato tubers was studied at the levels of transcription, RNA accumulation and translation. These results should help to improve synthesis for the expression of transgenes in amyloplasts of potato tubers by plastid transformation. In parallel, attempts at establishing a protocol for efficient plastid transformation of potato, were made.

Run-on transcription assays it showed that in amyloplasts the transcription rate of different genes are generally lower than in chloroplasts. Moreover the transcription rate in amyloplasts decreases further with age of and size of potato tubers. In amyloplasts isolated from small tubers transcription of housekeeping genes and some photosynthesis related genes could be detected, whereas in amyloplasts from large tubers only the ribosomal operon and the photosynthesis related gene *psbA* is transcribed. These results and primer extension analysis give rise to the assumption that in amyloplasts from large tubers only the plastid encoded RNA polymerase (PEP) is active. In amyloplasts from small tubers, in contrast transcripts derived from the nucleus encoded RNA polymerase (NEP) are detectable, which indicates the additional activity of NEP in amyloplasts from small tubers.

The comparison of steady state transcript levels showed that there are no differences in amyloplasts from small and large tubers while small differences between amyloplasts and chloroplasts were observed. With respect to the low transcription rate of the accumulating RNA-species in amyloplasts a high stability for these transcripts has to be proposed.

The correct splicing of transcripts coding for ribosomal proteins and immunological analysis indicates the presence of ribosomes in amyloplasts. In fact, the detection of polysomes in amyloplasts indicated an association of transcripts with the ribosomes. By analysis of the polysomal RNA it could be shown that the polysomal fraction has the same composition as the nonpolysomal fraction. The comparison of the polysomal RNA in amyloplasts with that of chloroplasts revealed that in amyloplasts small amounts of mRNAs and high amounts of ribosomal RNAs occur in this fraction. This result and the fact that most mRNAs are

present in the nonpolysomal fraction indicates that the ribosomes might be arrested and that hardly any initiation of translation can be found in amyloplasts. Furthermore, none of the amyloplast transcripts was specifically abundant in the polysomal fraction, which leads to the conclusion that no plastid gene product is required for amyloplast function.

The ultrastructure of plastids in subterranean sprouts of potato and the gene expression in amyloplasts give rise for the assumption that amyloplasts do not develop from proplastids. Instead, it is more likely that early stages of chloroplast development are the precursor of potato tuber amyloplasts. An alternative model for plastid differentiation is discussed.

To establish an efficient protocol for plastid transformation of potato, two different transformation cassettes were initially transformed in tobacco. The first carried the selection marker under control of the generally used ribosomal promoter for the PEP. In the second expression of the selection marker was driven by the full-length promoter of the ribosomal operon, which comprises the elements for the NEP as well as for the PEP. The comparison of both transformation cassettes by transformation in tobacco indicated a faster regeneration of transplastomic plants with the full-length promoter. Transformation of potato with the construct carrying the entire promoter did not lead to transplastomic plants. With regard to the results of the gene expression analysis in amyloplasts, which indicated very low protein synthesis rates, the approach of synthesising foreign proteins in potato tuber by plastid transformation, appears to be not advisable.

Literaturverzeichnis

- 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.
- BARKAN, A. (1993). Nuclear mutants of maize with defects in chloroplast polysome assembly have altered chloroplast RNA metabolism. *Plant Cell*, 5:389–402.
- BARKAN, A. und GOLDSCHMIDT-CLERMONT, M. (2000). Participation of nuclear genes in chloroplast gene expression. *Biochimie*, 82:559–572.
- BAUMGARTNER, B., RAPP, J. und MULLET, J. (1993). Transcription/translation apparatus are differentially transcribed early in barley (*Hordeum vulgare*) chloroplast development (Evidence for selective stabilization of *psbA* mRNA). *Plant Physiol.*, 101:781–791.
- BENDICH, A. (2004). Circular chloroplast chromosomes: the grand illusion. *Plant Cell*, 16:1661–1666.
- BIRNBOIM, H. und DOLY, J. (1979). A rapid extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.*, 7:1513–1523.
- BISANZ, C., BEGOT, L., CAROL, P., PEREZ, P., BLIGNY, M., PESEY, H., GALLOIS, J., LERBS-MACHE, S. und MACHE, R. (2003). The Arabidopsis nuclear DAL gene encodes a chloroplast protein which is required for the maturation of the plastid ribosomal RNAs and is essential for chloroplast differentiation. *Plant Mol. Biol.*, 51:651–663.
- BLIGNY, M., COURTOIS, F., THAMINY, S., CHANG, C.-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.
- BOCK, R. (2000). Sense from nonsense: how the genetic information of chloroplasts is altered by RNA editing. *Biochimie*, 82:549–557.

- BOUDREAU, E., NICKELSEN, J., LEMAIRE, S., OSSENBUHL, F. und JD, J. R. (2000). The *Nac2* gene of *Chlamydomonas* encodes a chloroplast TPR-like protein involved in *psbD* mRNA stability. *EMBO J.*, 19:3366–3376.
- 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.
- CHANG, C.-C., SHEEN, J., BLIGNY, M., NIWA, Y., LERBS-MACHE, S. und STERN, D. B. (1999). Functional analysis of two Maize cDNAs Encoding T7-like RNA polymerases. *Plant Cell*, 11:911–926.
- CHOQUET, Y. und WOLLMAN, F.-A. (2002). Translational regulations as specific traits of chloroplast gene expression. *FEBS Lett.*, 529:39–42.
- DANIELL, H. (2002). Molecular strategies for gene containment in transgenic crops. *Nat. Biotechnol.*, 20:581–586.
- DANIELL, H., KHAN, M. und ALLISON, L. (2002). Milestones in chloroplast genetic engineering: an environmentally friendly era in biotechnology. *Trends Plant Sci.*, 7:84–91.
- DANIELL, H., KUMAR, S. und DUFOURMANTEL, N. (2005). Breakthrough in chloroplast genetic engineering of agronomically important crops. *Trends Biotechnol.*, 23:238–245.
- DANIELL, H., MUTHUKUMAR, B. und LEE, S. (2001). Marker free transgenic plants: engineering the chloroplast genome without the use of antibiotic selection. *Curr. Genet.*, 39:109–116.
- DE COSA, B., MOAR, W., LEE, S., MILLER, M. und DANIELL, H. (2001). Overexpression of the Bt cry2Aa2 operon in chloroplasts leads to formation of insecticidal crystals. *Nat. Biotechnol.*, 19:71–74.
- DENG, X., STERN, D., TONKYN, J. und GRUISSEM, W. (1987). Plastid run-on transcription. Application to determine the transcriptional regulation of spinach plastid genes. *J. Biol. Chem.*, 262:9641–9648.

- DENG, X.-W. und GRUISSEM, W. (1988). Constitutive transcription and regulation of gene expression in non-photosynthetic plastids of higher plants. *EMBO J.*, 7:3301–3308.
- DRAPIER, D., GIRARD-BASCOU, J. und WOLLMAN, F. (1992). Evidence for nuclear control of the expression of the *atpA* and *atpB* chloroplast genes in *Chlamydomonas*. *Plant Cell*, 4:283–295.
- EBERHARD, S., DRAPIER, D. und WOLLMAN, F. (2002). Searching limiting steps in the expression of chloroplast-encoded proteins: relations between gene copy number, transcription, transcript abundance and translation rate in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J.*, 31:149–160.
- 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.
- FALK, H., LIEDVOGEL, B. und SITTE, P. (1974). Circular DNA in isolated chromoplasts. *Z. Naturforsch.*, 29C:541–546.
- FALK, J., SCHMIDT, A. und KRUPINSKA, K. (1993). Characterization of plastid DNA transcription in heat-bleached barley leaves. *J. Plant Physiol.*, 141:176–181.
- FEIERABEND, J., SCHLÜTER, W. und TEBARTZ, K. (1988). Unassembled polypeptides of the plastidic ribosomes in heat-treated 70S-ribosome-deficient rye leaves. *Planta*, 174:542–550.
- FROMM, H., EDELMAN, M., KOLLER, B., GOLOUBINOFF, P. und GALUN, E. (1986). The enigma of the gene coding for ribosomal S12 in chloroplasts of *Nicotiana*. *Nucl. Acids Res.*, 14:883–898.
- FUJIWARA, M., NAGASHIMA, A., KANAMARU, K., TANAKA, K. und TAKAHASHI, H. (2000). Three new nuclear genes, sigD, sigE and sigF, encoding putative plastid RNA polymerase σ factors in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.*, 481:47–52.

- FULTON, T. M., CHUNGWOGNSE, J. und TANKSLEY, S. (1995). Microprep protocol for extraction of DNA from tomato and other herbaceous plants. *Plant Mol. Biol.*, 13:207–209.
- GOLDSCHMIDT-CLERMONT, M. (1991). Transgenic expression of aminoglycoside adenine transferase in the chloroplast: a selectable marker of site-directed transformation of *Chlamydomonas*. *Nucleic Acids Res.*, 19:4083–4089.
- GRAY, M. (1998). The evolutionary origins of organelles. *Trends Genet.*, 5:294–299.
- GRUISSEM, W. und TONKYN, J. (1993). Control mechanisms of plastid gene expression. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 12:19–55.
- HAGER, M., BIEHLER, K., ILLERHAUS, J., RUF, S. und BOCK, R. (1999). Targeted inactivation of the smallest plastid genome-encoded open reading frame reveals a novel and essential subunit of the cytochrome $b_{(6)}f$ complex. *EMBO J.*, 18:5834–5842.
- 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.
- HAJDUKIEWICZ, P., GILBERTSON, L. und STAUB, J. (2001). Multiple pathways for *Cre/lox*-mediated recombination in plastids. *Plant J.*, 27.
- HANAOKA, M., KANAMARU, K., FUJIWARA, M., TAKAHASHI, H. und K., K. T. (2005). Glutamyl-tRNA mediates a switch in RNA polymerase use during chloroplast biogenesis. *EMBO Rep.*, 6:545–550.
- HANAOKA, M., KANAMARU, K., TAKAHASHI, H. und TANAKA, K. (2003). Molecular genetic analysis of chloroplast gene promoters dependent on SIG2, a nucleus-encoded sigma factor for the plastid-encoded RNA polymerase, in *Arabidopsis thaliana*. *Nucl. Acids Res.*, 31:7090–7098.
- HAYES, R., KUDLA, J. und GRUISSEM, W. (1999). Degrading chloroplast mRNA: the role of polyadenylation. *Trends Biochem. Sci.*, 24:199–202.

- HEDTKE, B., BÖRNER, T. und WEIHE, A. (1997). Mitochondrial and chloroplast phage-type RNA polymerases in Arabidopsis. *Science*, 277:809–811.
- HEDTKE, B., MEIXNER, M., GILLANDT, S., RICHTER, S., BÖRNER, T. und WEIHE, A. (1999). Green fluorescent protein as marker to investigate targeting of organellar RNA polymerases of 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.
- HERRIN, D. und NICKELSEN, J. (2004). Chloroplast RNA processing and stability. *Photosynth. Res.*, 82:301–314.
- HERRMAN, R., WESTHOFF, P. und LINK, G. (1992). Biogenesis of plastids in higher plants. In: *Plant Gene Research: Cell Organelles*, herausgegeben von R. Herrmann, Bd. 6, Springer-Verlag Wien New York, 275–349.
- HESS, W. und BÖRNER, T. (1999). Organellar RNA polymerases in higher plants. *Int. Rev. Cyt.*, 190:1–95.
- HESS, W., HOCH, B., ZELTZ, P., HÜBSCHMANN, T., KÖSSEL, H. und BÖRNER, T. (1994). Inefficient *rpl2* splicing in barley mutants with ribosome-deficient plastids. *Plant Cell*, 6:1455–1465.
- HILDEBRANDT, M., HALLICK, R., PASSAVANT, C. und BOURQUE, D. (1988). Trans-splicing in chloroplasts: the *rps12* loci of *Nicotiana tabacum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:372–376.
- HIROSE, T., KUSUMEGI, T., TSUDZUKI, T. und SUGIURA, M. (1999). RNA editing sites in tobacco chloroplast transcripts: editing as a possible regulator of chloroplast RNA polymerase activity. *Mol. Gen. Genet.*, 262:462–467.
- HIROSE, T. und SUGIURA, M. (1996). *Cis*-acting elements and *trans*-acting factors for accurate translation of chloroplast *psbA* mRNAs: development of an *in vitro* translation system from tobacco chloroplasts. *EMBO J.*, 15:1687–1695.

- HIROSE, T. und SUGIURA, M. (2004a). Functional Shine-Dalgarno-like sequences for translational initiation of chloroplast mRNAs. *Plant Cell Physiol.*, 45:114–117.
- HIROSE, T. und SUGIURA, M. (2004b). Multiple elements required for translation of plastid *atpB* mRNA lacking the Shine-Dalgarno sequence. *Nucl. Acids Res.*, 32:3503–3510.
- HOU, B., ZHOU, Y., WAN, L., ZHANG, Z., SHEN, G., CHEN, Z. und HU, Z. (2003). Chloroplast transformation in oilseed rape. *Transgenic Res.*, 12:111–114.
- 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. *Nucl. Acids Res.*, 19:3431–3434.
- HUANG, F., KLAUS, S., HERZ, S., ZOU, Z., KOOP, H. und GOLDS, T. (2002). Efficient plastid transformation in tobacco using the *aphA-6* gene and kanamycin selection. *Mol. Genet. Genom.*, 268:19–27.
- HÜBSCHMANN, T., HESS, W. und BÖRNER, T. (1996). Impaired splicing of the *rps12* transcript in ribosome-deficient plastids. *Plant Mol. Biol.*, 30:109–123.
- 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.
- IAMTHAM, S. und DAY, A. (2000). Removal of antibiotic resistance genes from transgenic tobacco plastids. *Nat. Biotechnol.*, 18:1172–1176.
- ISONO, K., SHIMIZU, M., YOSHIMOTO, K., NIWA, Y., SATOH, K., YOKOTA, A. und KOBAYASHI, H. (1997). Leaf-specifically expressed genes for polypeptides destined for chloroplasts with domains of σ^{70} factors of bacterial RNA polymerases in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:14948–14953.

- KANAMARU, K., NAGASHIMA, A., FUJIWARA, M., SHIMADA, H., SHIRANO, Y., NAKABAYASHI, K., SHIBATA, D., TANAKA, K. und TAKAHASHI, H. (2001). An Arabidopsis sigma factor (SIG2)-dependent expression of plastid-encoded tRNAs in chloroplasts. *Plant Cell Physiol.*, 42:1034–1043.
- KANAMARU, K. und TANAKA, K. (2004). Roles of chloroplast RNA polymerase sigma factors in chloroplast development and stress response in higher plants. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 68:2215–2223.
- KARNOVSKY, J. M. (1965). A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.*, 27.
- KIM, J., KLEIN, P. und MULLET, J. (1991). Ribosomes pause at specific sites during synthesis of membrane-bound chloroplast reaction center protein D1. *J. Biol. Chem.*, 266:14931–14938.
- KIM, J., KLEIN, P. und MULLET, J. (1994). Synthesis and turnover of photosystem II reaction center protein D1. Ribosome pausing increases during chloroplast development. *J. Biol. Chem.*, 269:17918–17923.
- KIM, M., CHRISTOPHER, D. und MULLET, J. (1993). Direct evidence for selective modulation of *psbA*, *rpoA*, *rbcL* and 16S RNA stability during barley chloroplast development. *Plant Mol. Biol.*, 22:447–463.
- KLAUS, S., HUANG, F., GOLDS, T. und KOOP, H. (2004). Generation of marker-free plastid transformants using a transiently cointegrated selection gene. *Nat. Biotechnol.*, 22:225–229.
- KLEBER-JANKE, T. und KRUPINSKA, K. (1997). Isolation of cDNA clones showing enhanced expression in barley leaves during dark-induced as well as during senescence under field conditions. *Planta*, 203:332–340.
- KLEIN, R., MASON, H. und MULLET, J. (1988). Transcripts of *psaA-psaB*, *psbA* and *rbcL* are associated with polysomes in dark-grown and illuminated barley seedlings. *J. Cell Biol.*, 106:289–301.

- KLEIN, R. und MULLET, J. (1990). Light-induced transcription of chloroplast genes. *psbA* transcription is differentially enhanced in barley seedlings. *J. Biol. Chem.*, 265:1895–1902.
- KOBAYASHI, H., NGERNPRASIRTSIRI, J. und AKAZAWA, T. (1990). Transcriptional regulation and DNA methylation in plastids during transitional conversion of chloroplasts to chromoplasts. *EMBO J.*, 9:307–313.
- KOOP, H., STEINMÜLLER, K., WAGNER, H., RÖSSLER, C., EIBL, C. und SACHER, L. (1996). Integration of foreign sequences into the tobacco plastome via polyethylene glycol-mediated protoplast transformation. *Planta*, 199:193–201.
- KRAUSE, K., FALK, J., HUMBECK, K. und KRUPINSKA, K. (1998). Responses of the transcriptional apparatus of barley chloroplasts to a prolonged dark period and to subsequent reillumination. *Physiol. Plant.*, 104:143–152.
- 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.
- LAEMMLI, U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680–685.
- LAHIRI, S. und ALLISON, L. (2000). Complementary expression of two plastid-localized σ -like factors in maize. *Plant Physiol.*, 123:883–894.
- LAHIRI, S., YAO, J., MC CUMBERS, C. und ALLISON, L. (1999). Tissue-specific and light-dependent expression within a family of nuclear-encoded sigma-like factors from *Zea mays*. *Mol. Cell Biol. Res. Commun.*:14–20.

- LEGEN, J., KEMP, S., KRAUSE, K., PROFANTER, B., HERRMANN, R. und MAIER, R. (2002). Comparative analysis of plastid transcription profiles of entire plastid chromosomes from tobacco attributed to wild-type and PEP-deficient transcription machineries. *Plant J.*, 31:171–188.
- LELIVELT, C., MC CABE, M., NEWELL, C., DESNOO, C., VAN DUN, K., BIRCH-MACHIN, I., GRAY, J., MILLS, K. und NUGENT, J. (2005). Stable plastid transformation in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Plant Mol. Biol.*, 58:763–774.
- LERBS-MACHE, S. (2000). Regulation of rDNA transcription in plastids of higher plants. *Biochimie*, 82:525–535.
- LICHTENTHALER, H. (1987). Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymol.*, 148:350–382.
- LISITSKY, I., KLAFF, P. und SCHUSTER, G. (1997). Blocking polyadenylation of mRNA in the chloroplast inhibits its degradation. *Plant J.*, 12:1173–1178.
- LOGEMANN, J., SCHELL, J. und WILLMITZER, L. (1987). Improved method for the isolation of RNA from plant tissue. *Anal. Biochem.*, 163:16–20.
- MACHEREL, D., KOBAYASHI, H., AKAZAWA, T., KAWANO, S. und KUROIWA, T. (1985). Amyloplast nucleoids in sycamore cells and presence in amyloplast DNA of homologous sequences to chloroplast genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 133:140–146.
- MALIGA, P. (1998). Two plastid RNA polymerases of higher plants: an evolving story. *Trends Sci.*, 3:4–6.
- MALIGA, P. (2003). Progress towards commercialization of plastid transformation technology. *Trends Biotechnol.*, 21:20–28.
- MANDEL, M. und HIGA, A. (1970). Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.*, 53:159–162.
- MANNING, J., WOLSTENHOLME, D., RYAN, R., HUNTER, J. und RICHARDS, O. (1971). Circular chloroplast DNA from *Euglena gracilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 68:1169–1173.

- MANUELL, A., BELIGNI, M., YAMAGUCHI, K. und MAYFIELD, S. (2004). Regulation of chloroplast translation: interactions of RNA elements, RNA-binding proteins and the plastid ribosome. *Biochem. Soc. Trans.*, 32:601–605.
- MARTIN, W. und HERRMANN, R. (1998). Gene transfer from organelles to the nucleus: how much, what happens and why? *J. Plant Physiol.*, 118:9–17.
- MARTIN, W., RUJAN, T., RICHLY, E., HANSEN, A., CORNELSEN, S., LINS, T., LEISTER, D., STOEBE, B., HASEGAWA, M. und PENNY, D. (2002). Evolutionary analysis of *Arabidopsis*, cyanobacterial, and chloroplast genomes reveals plastid phylogeny and thousands of cyanobacterial genes in the nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99:12246–12251.
- MATSUBAYASHI, T., WAKASUGI, T., SHINOZAKI, K., YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K., ZAITA, N., HIDAKA, T., MENG, B., OHTO, C., TANAKA, M., KATO, A., MARUYAMA, T. und SUGIURA, S. (1987). Six chloroplast genes (*ndhA-F*) homologous to human mitochondrial genes encoding components of the respiratory chain NADH dehydrogenase are actively expressed: determination of the splice sites in *ndhA* and *ndhB* pre-mRNAs. *Mol. Gen. Genet.*, 210:385–393.
- MAYFIELD, S., YOHN, C., COHEN, A. und DANON, A. (1995). Regulation of chloroplast gene expression. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 46:147–166.
- MC FADDEN, G. (1999). Endosymbiosis and evolution of the plant cell. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2:513–519.
- MEURER, J., BERGER, A. und P, P. W. (1996). A nuclear mutant of *Arabidopsis* with impaired stability on distinct transcripts of the plastid *psbB*, *psbD/C*, *ndhH*, and *ndhC* operons. *Plant Cell*, 8:1193–11207.
- MONDE, R., SCHUSTER, G. und STERN, D. (2000). Processing and degradation of chloroplast mRNA. *Biochimie*, 82:573–582.
- 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.

- MULLET, J. (1993). Dynamic regulation of chloroplast transcription. *Plant Physiol.*, 103:309–313.
- MURASHIGE, T. und SKOOK, F. (1962). A revised medium for the growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.*, 15:473–497.
- NAVER, H. und ROCHAIX, E. B. J. (2001). Functional studies of *Ycf3*: its role in assembly of photosystem I and interactions with some of its subunits. *Plant Cell*, 13:2731–2745.
- NGERNPRASIRTSIRI, J., KOBAYASHI, H. und AKAZAWA, T. (1988a). DNA methylation as a mechanism of transcriptional regulation in nonphotosynthetic plastids in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:4750–4754.
- NGERNPRASIRTSIRI, J., KOBAYASHI, H. und AKAZAWA, T. (1988b). DNA methylation occurred around lowly expressed genes of plastid DNA during tomato fruit development. *Plant Physiol.*, 88:16–20.
- NGUYEN, T., NUGENT, G. und DIX, T. C. P. (2005). Generation of homoplasmic plastid transformants of a commercial cultivar of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant Science*, 168:1495–1500.
- NICKELSEN, J., VAN DILLEWIJN, J., RAHIRE, M. und ROCHAIX, J. (1994). Determinants for stability of the chloroplast *psbD* RNA are located within its short leader region in *Chlamydomonas reinhardtii*. *EMBO J.*, 13:3182–3191.
- NIERZWICK-BAUER, S., BALKWILL, D. und JR., S. S. (1984). Heterocyst differentiation in the Cyanobakterium *Mastigocladus laminous*. *J. Bacteriol.*, 157:514–525.
- PALMER, J. (1991). Plastid chromosomes: structure and evolution. In: The molecular biology of plastids, Academic Press, San Diego, 5–53.
- PALMER, J. D. (1990). Contrasting modes and tempos of genome evolution in land plant organelles. *Trends Genet.*, 6:115–120.
- REISFELD, A., GRESSEL, J., JAKOB, K. und EDELMAN, M. (1982). Fractionation of chloroplast RNA by polyacrylamid gel electrophoresis and sucrose density gradients. In: Methods in chloroplast molecular biology, Elsevier Biomedical Press, 393–405.

- REYNOLDS, E. (1963). The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.*, 17:208–212.
- RIS, H. und PLAUT, W. (1962). Ultrastructure of DNA-containing areas in the chloroplasts of *Chlamydomonas*. *J. Cell Biol.*, 13:383–391.
- RODERMEL, S., HALEY, J., JIANG, C., TSAI, C. und BOGORAD, L. (1996). A mechanism for intergenomic integration: abundance of ribulose biphosphate carboxylase small-subunit protein influences the translation of the large-subunit mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:3881–3885.
- RUF, S., HERMANN, M., BERGER, I., CARRER, H. und BOCK, R. (2001). Stable genetic transformation of tomato plastids and expression of a foreign protein in fruit. *Nat. Biotechnol.*, 19:870–875.
- SAKAI, A., KAWANO, S. und KUROIWA, T. (1992). Conversion of proplastids to amyloplasts in tobacco cultured cells is accompanied by changes in the transcriptional activities of plastid genes. *Plant Physiol.*, 100:1062–1066.
- SALVADOR, M. und KLEIN, U. (1999). The redox state regulates RNA degradation in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.*, 121:1367–1374.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. und MANIATIS, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Press, New York, 2 Aufl.
- SATOH, J., BABA, K., NAKAHIRA, Y., TSUNOYAMA, Y., T, S. und TOYOSHIMA, Y. (1999). Developmental stage-specific multi-subunit plastid RNA polymerases (PEP) in wheat. *Plant J.*, 18(4):407–415.
- SCHANTZ, R. und BOGORAD, L. (1988). Maize chloroplast genes *ndhD*, *ndhE*, and *psaC*. Sequences, transcripts and transcript pool. *Plant Mol. Biol.*, 11:239–247.
- SCHIMPER, A. F. W. (1883). Über die Entwicklung der Chlorophyllkörner und Farbkörner. *Botanische Zeitung*, 41:105–112, 121–131, 137–146, 153–162.

- SCHIMPER, A. F. W. (1885). Untersuchungen über die Chlorophyllkörner und die ihnen homologen Gebilde. *Jahrb. Wiss. Bot.*, 16:1–27.
- SCHUSTER, G., LISITSKY, I. und KLAFF, P. (1999). Polyadenylation and degradation of mRNA in the chloroplast. *Plant Physiol.*, 120:937–944.
- SHINOZAKI, K., OHME, M., TANAKA, M., WAKASUGI, T., HAYASHIDA, N., MATSUBAYASHI, T., ZAITA, N., CHUNWONGSE, J., OBOKATA, J., YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K., OHTO, C., TORAZAWA, K., MENG, B. Y., SUGITA, M., DENO, H., KAMOGASHIRA, T., YAMADA, K., KUSUDA, J., TAKAIWA, F., KATO, A., TOHDOH, N., SHIMADA, H., und SUGIURA, M. (1986). The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome: its gene organization and expression. *EMBO J.*, 5:2043–2049.
- SIDOROV, A., KASTEN, D., PANGAND, S.-Z., HAJDUKIEWICZ, P., STAUB, J. und NEHRA, S. (1999). Stable chloroplast transformation in potato: use of green fluorescent protein as a plastid marker. *Plant J.*, 19:209–216.
- STAUDINGER, M. und KEMPKEN, F. (2003). Electroporation of isolated higher-plant mitochondria: transcripts of an introduced *cox2* gene, but not an *atp6* gene, are edited *in organello*. *Mol. Gen. Genet.*, 269:553–561.
- STOLLAR, N., KIM, J. und HOLLINGSWORTH, M. (1994). Ribosomes pause during the expression of the large ATP synthase gene cluster in spinach chloroplasts. *Plant Physiol.*, 105:1167–1177.
- SUGITA, M. und SUGIURA, M. (1996). Regulation of gene expression in chloroplasts of higher plants. *Plant Mol. Biol.*, 32:315–326.
- SUGIURA, M., HIROSE, T. und SUGITA, M. (1998). Evolution and mechanism of translation in chloroplasts. *Annu. Rev. Genet.*, 32:437–459.
- SUGIURA, M., SHINOZAKI, K., ZAITA, N., KUSUDA, M. und KUMANO, M. (1986). Clone bank of the tobacco (*Nicotiana tabacum*) chloroplast genome as a set of overlapping restriction endonuclease fragments: mapping of eleven ribosomal protein genes. *Plant Science*, 44:211–216.

- SVAB, Z., HAJDUKIEWICZ, P. und MALIGA, P. (1990). Stable transformation of plastids in higher plants. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 87:8526–8530.
- SVAB, Z. und MALIGA, P. (1993). High-frequency plastid transformation in tobacco by selection for a chimeric *aadA* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 90:913–917.
- SWIATEK, M., KURAS, R., SOKOLENKO, A., HIGGS, D., OLIVE, J., CINQUE, G., MÜLLER, B., EICHACKER, L., STERN, D. B., BASSI, R., HERRMANN, R. und WOLLMAN, F.-A. (2001). The chloroplast gene *ycf9* encodes a photosystem II (PSII) core subunit, PsbZ, that participates in PSII supramolecular architecture. *Plant Cell*, 13:1347–1368.
- TAN, S. und TROXLER, R. (1999). Characterization of two chloroplast RNA polymerase sigma factors from *Zea mays*: photoregulation and differential expression. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 96:5316–5321.
- TANAKA, K., TOZAWA, Y., MOCHIZUKI, N., SHINOZAKI, K., NAGATANI, A., WAKASA, K. und TAKAHASHI, H. (1997). Characterization of three cDNA species encoding plastid RNA polymerase sigma factors in *Arabidopsis thaliana*: evidence for the sigma factor heterogeneity in higher plant plastids. *FEBS Lett.*, 413:309–313.
- TILLER, K., EISERMANN, A. und LINK, G. (1991). The chloroplast transcription apparatus from mustard (*Sinapis alba* L.). Evidence for three different transcription factors which resemble bacterial sigma factors. *Eur. J. Biochem.*, 198:93–99.
- TILLER, K. und LINK, G. (1993). Sigma-like transcription factors from mustard (*Sinapis alba* L.) etioplast are similar in size to, but functionally distinct from, their chloroplast counterparts. *Plant Mol. Biol.*, 21:503–513.
- TOZAWA, Y., TANAKA, K., TAKAHASHI, H. und WAKASA, K. (1998). Nuclear encoding of a plastid sigma factor in rice and its tissue- and light-dependent expression. *Nucleic Acids Res.*, 26:415–419.
- VAN DER KOOIJ, T., KRAUSE, K., DÖRR, I. und KRUPINSKA, K. (2000). Molecular, functional and ultrastructural characterisation of plastids from six species of the parasitic flowering plant genus *Cuscuta*. *Planta*, 210:701–707.

- VERA, A. und SUGIURA, M. (1994). A novel RNA gene in the tobacco plastid genome: its possible role in the maturation of 16S rRNA. *EMBO J.*, 13:2211–2217.
- WAKASUGI, T., SUGITA, M., TSUDZUKI, T. und SUGIURA, M. (1998). Updated gene map of tobacco chloroplast DNA. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 16:231–241.
- WATSON, M. (1958). Staining of tissue section for electron microscopy with heavy metals. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 4:475–478.
- WHATLEY, J. (1977). Variations in the basic pathway in chloroplast development. *New Phytol.*, 78:407–420.
- WHATLEY, J. (1978). A suggested cycle of plastid developmental interrelationships. *New Phytol.*, 80:489–502.
- WHATLEY, J. (1983). Plastids in the roots of *Phaseolus vulgaris*. *New Phytol.*, 94:381–391.
- WHITFIELD, P. und BOTTOMLEY, W. (1983). Organization and structure of chloroplast genes. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 34:279–310.
- WISCHMANN, B., NIELSEN, T. und LINDBERG-MØLLER, B. (1999). *In vitro* biosynthesis of phosphorylated starch in intact potato amyloplasts. *Plant Physiol.*, 119:455–462.
- WOLFE, K., MORDEN, C. und PALMER, J. (1992). Function and evolution of a minimal genome from a nonphotosynthetic parasitic plant. *Proc Natl. Acad. Sci., USA*, 89:10648–10652.
- WUTTKE, H.-G. (1976). Circular DNA in chromoplasts of *Tulipy gesneriana*. *Planta*, 132:317–319.
- YAMAGUCHI, K. und SUBRAMANIAN (2000). The plastid ribosomal proteins. Identification of all the proteins in the 50S subunit of an organelle ribosome (chloroplast). *J. Biol. Chem.*, 275(37):28466–28482.
- YAMAGUCHI, K., VON KNOBLAUCH, K. und SUBRAMANIAN, A. (2000). The plastid ribosomal proteins. Identification of all the proteins in the 30S subunit of an organelle ribosome (chloroplast). *J. Biol. Chem.*, 275:28455–28465.

- YAO, J. und ALLISON, L. (1998). The cDNA sequence of *AtSig4*, a new member of the nuclear-encoded sigma-like factor gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.*, 118:1533.
- ZERGES, W. (2000). Translation in chloroplasts. *Biochimie*, 82:583–601.
- ZHANG, L., PAAKKARINEN, W., VAN WIJK, K. und ARO, E. (2000). Biogenesis of the chloroplast-encoded D1 protein: regulation of translation elongation, insertion, and assembly into photosystem II. *Plant Cell*, 12:1769–1782.

A Anhang

A.1 Detaillierte Darstellung der Transkriptionsanalyse

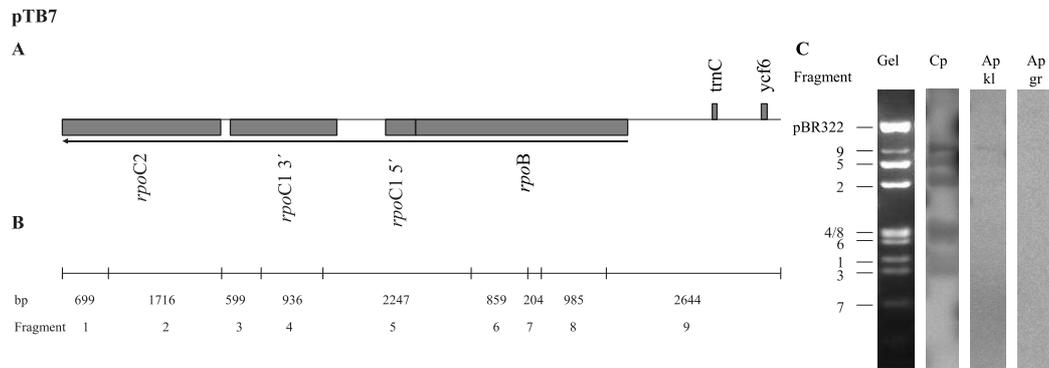


Abb. 33: 'Run-on'-Analyse des pDNA-Fragments B7 aus Tabak. (A) Schematische Darstellung der Gene auf dem pDNA-Fragment B7. Transkriptionseinheiten und -richtung sind durch Pfeile markiert. (B) Restriktionskarte des Fragments nach Verdau mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Eco*RI in Relation zur Lage der Gene. Die Größe der Fragmente ist angegeben. (C) Restriktionsfragmente des pDNA-Subklons pTB7 nach gelelektrophoretischer Auftrennung (Gel) und die Autoradiogramme nach der Hybridisierung mit 'Run-on'-Transkripten aus Chloroplasten (Cp), Amyloplasten (Ap) aus Knollen mit einer durchschnittlichen Größe von 0,75 - 1 cm (kl) bzw. 2 - 2,5 cm (gr) sind gezeigt. Die DNA-Fragmente sind entsprechend B nummeriert.

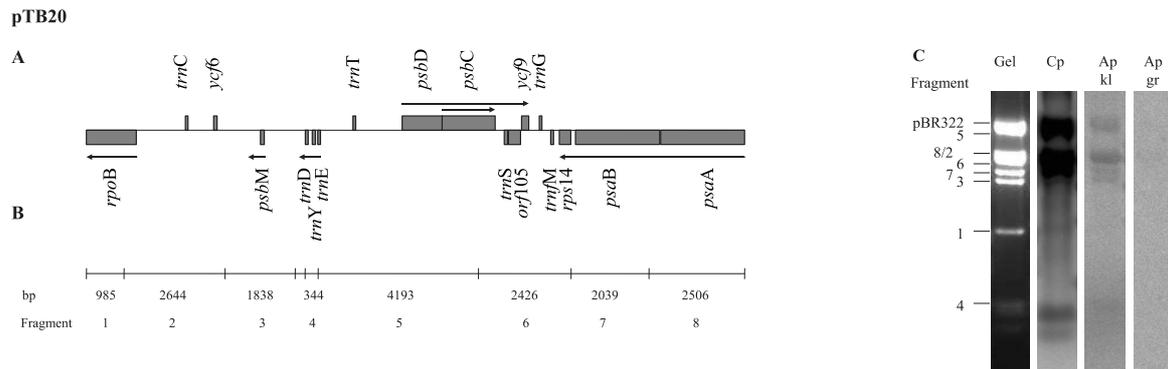


Abb. 34: 'Run-on'-Analyse des pDNA-Fragments B20 aus Tabak. (A) Schematische Darstellung der Gene auf dem pDNA-Fragment B20. Transkriptionseinheiten und -richtung sind durch Pfeile markiert. (B) Restriktionskarte des Fragments nach Verdau mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Eco*RI in Relation zur Lage der Gene. Die Größe der Fragmente ist angegeben. (C) Restriktionsfragmente des pDNA-Subklons pTB20 nach gelelektrophoretischer Auftrennung (Gel) und die Autoradiogramme nach der Hybridisierung mit 'Run-on'-Transkripten aus Chloroplasten (Cp), Amyloplasten (Ap) aus Knollen mit einer durchschnittlichen Größe von 0,75 - 1 cm (kl) bzw. 2 - 2,5 cm (gr) sind gezeigt. Die DNA-Fragmente sind entsprechend B nummeriert.

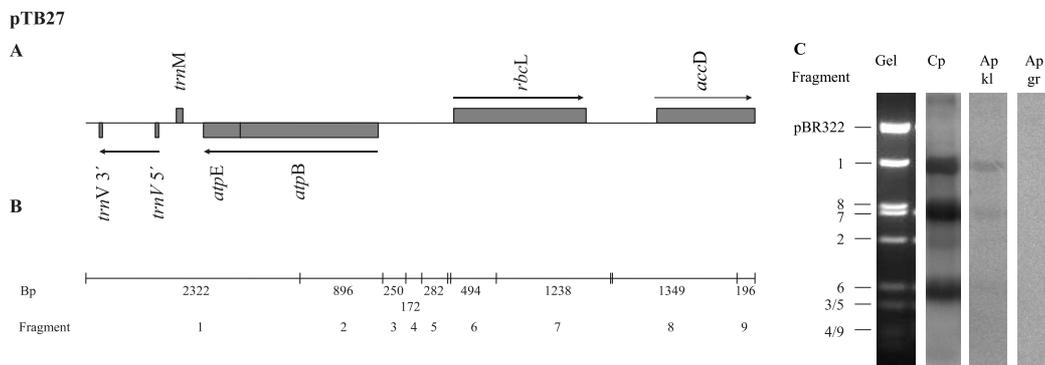


Abb. 35: 'Run-on'-Analyse des pDNA-Fragments B27 aus Tabak. (A) Schematische Darstellung der Gene auf dem pDNA-Fragment B27. Transkriptionseinheiten und -richtung sind durch Pfeile markiert. (B) Restriktionskarte des Fragments nach Verdau mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Eco*RI in Relation zur Lage der Gene. Die Größe der Fragmente ist angegeben. (C) Restriktionsfragmente des pDNA-Subklons pTB27 nach gelelektrophoretischer Auftrennung (Gel) und die Autoradiogramme nach der Hybridisierung mit 'Run-on'-Transkripten aus Chloroplasten (Cp), Amyloplasten (Ap) aus Knollen mit einer durchschnittlichen Größe von 0,75 - 1 cm (kl) bzw. 2 - 2,5 cm (gr) sind gezeigt. Die DNA-Fragmente sind entsprechend B nummeriert.

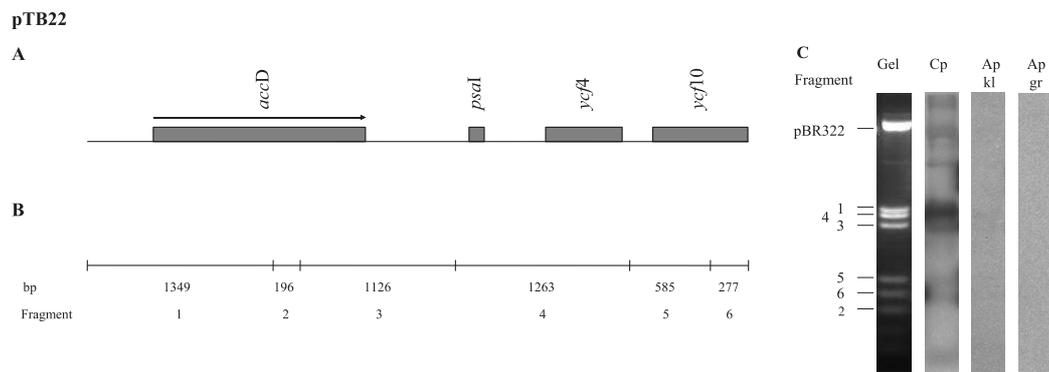


Abb. 36: 'Run-on'-Analyse des pDNA-Fragments B22 aus Tabak. (A) Schematische Darstellung der Gene auf dem pDNA-Fragment B22. Transkriptionseinheiten und -richtung sind durch Pfeile markiert. (B) Restriktionskarte des Fragments nach Verdau mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Eco*RI in Relation zur Lage der Gene. Die Größe der Fragmente ist angegeben. (C) Restriktionsfragmente des pDNA-Subklons pTB22 nach gelelektrophoretischer Auftrennung (Gel) und die Autoradiogramme nach der Hybridisierung mit 'Run-on'-Transkripten aus Chloroplasten (Cp), Amyloplasten (Ap) aus Knollen mit einer durchschnittlichen Größe von 0,75 - 1 cm (kl) bzw. 2 - 2,5 cm (gr) sind gezeigt. Die DNA-Fragmente sind entsprechend B nummeriert.

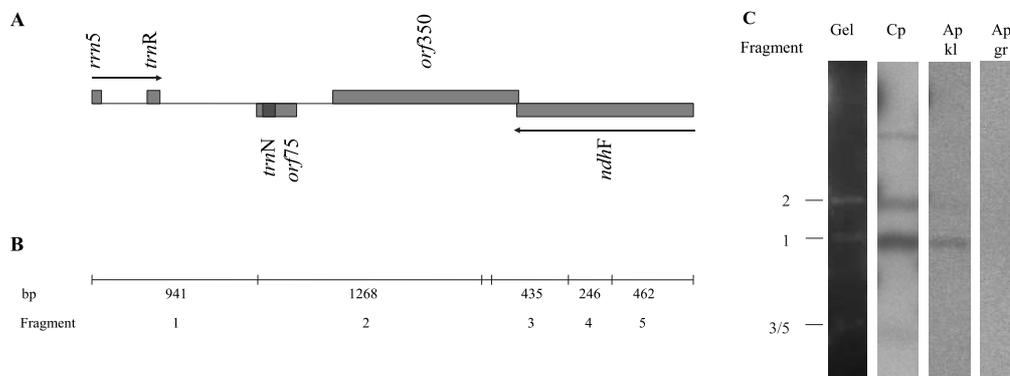


Abb. 37: 'Run-on'-Analyse des PCR-Fragments aus Tabak. (A) Schematische Darstellung der Gene auf dem PCR-Fragments. Transkriptionseinheiten und -richtung sind durch Pfeile markiert. (B) Restriktionskarte des PCR-Fragments nach Verdau mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Eco*RI in Relation zur Lage der Gene. Die Größe der Fragmente ist angegeben. (C) Restriktionsfragmente nach gelelektrophoretischer Auftrennung (Gel) und die Autoradiogramme nach der Hybridisierung mit 'Run-on'-Transkripten aus Chloroplasten (Cp), Amyloplasten aus Knollen mit einer durchschnittlichen Größe von 0,75 - 1 cm bzw. 2 - 2,5 cm sind gezeigt. Die DNA-Fragmente sind entsprechend B nummeriert.

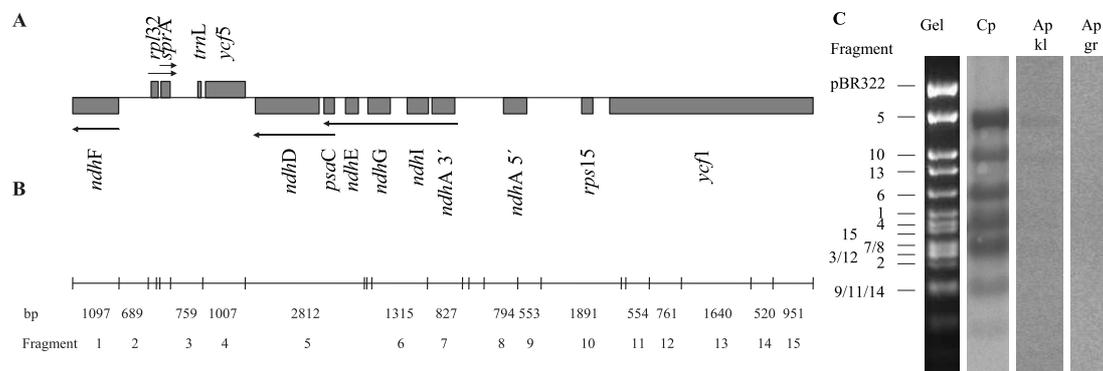


Abb. 38: 'Run-on'-Analyse des pDNA-Fragments Ba2 aus Tabak. (A) Schematische Darstellung der Gene auf dem pDNA-Fragment Ba2. Transkriptionseinheiten und -richtung sind durch Pfeile markiert. (B) Restriktionskarte des pDNA-Fragments Ba2 des Fragments nach Verdau mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Eco*RI in Relation zur Lage der Gene. Die Größe der Fragmente ist angegeben. (C) Restriktionsfragmente nach gelelektrophoretischer Auftrennung (Gel) und die Autoradiogramme nach der Hybridisierung mit 'Run-on'-Transkripten aus Chloroplasten (Cp), Amyloplasten aus Knollen mit einer durchschnittlichen Größe von 0,75 - 1 cm bzw. 2 - 2,5 cm sind gezeigt. Die DNA-Fragmente sind entsprechend B nummeriert.

A.2 Detaillierte Darstellung der Analysen zur Transkriptzusammensetzung

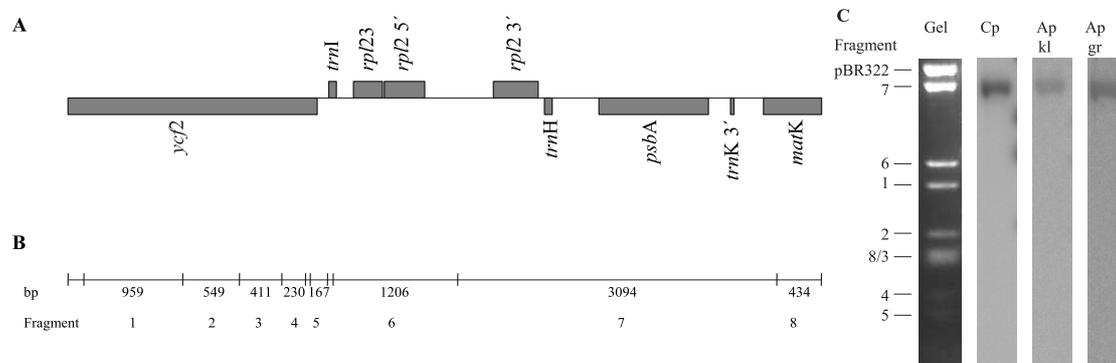


Abb. 39: Analyse der Transkriptzusammensetzung von Amyloplasten. (A) Schematische Darstellung der Gene auf dem pDNA - Fragment B28. (B) Restriktionskarte des Fragments nach Verdau mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Eco*RI in Relation zur Lage der Gene. Die Größe der Fragmente ist angegeben. (C) Restriktionsfragmente des pDNA - Subklons pTB28 nach gelelektrophoretischer Auftrennung (Gel) und die Autoradiogramme nach der Hybridisierung mit markierter RNA aus Chloroplasten (Cp), Amyloplasten aus Knollen mit einer durchschnittlichen Größe von 0,75 - 1 cm und 2 - 2,5 cm sind gezeigt. Die DNA-Fragmente sind entsprechend B nummeriert.

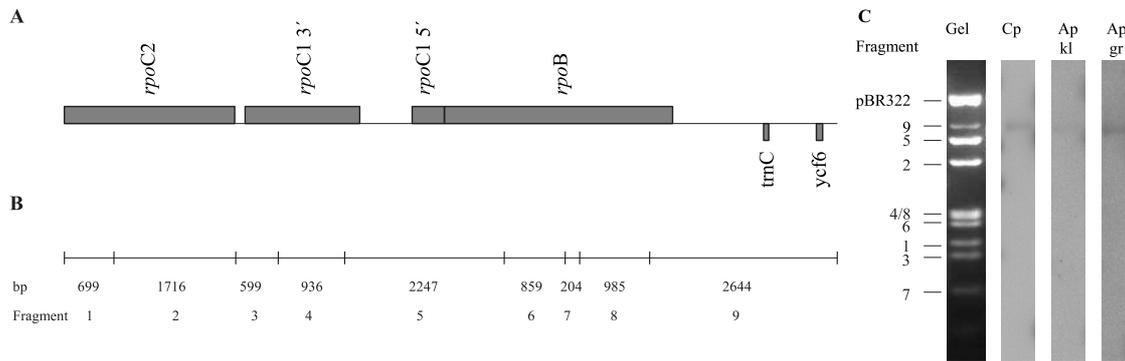


Abb. 40: Analyse der Transkriptzusammensetzung von Amyloplasten. (A) Schematische Darstellung der Gene auf dem pDNA - Fragment B7. (B) Restriktionskarte des Fragments nach Verdau mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Eco*RI in Relation zur Lage der Gene. Die Größe der Fragmente ist angegeben. (C) Restriktionsfragmente des pDNA - Subklons pTB7 nach gelelektrophoretischer Auftrennung (Gel) und die Autoradiogramme nach der Hybridisierung mit markierter RNA aus Chloroplasten (Cp), Amyloplasten aus Knollen mit einer durchschnittlichen Größe von 0,75 - 1 cm und 2 - 2,5 cm sind gezeigt. Die DNA-Fragmente sind entsprechend B numeriert.

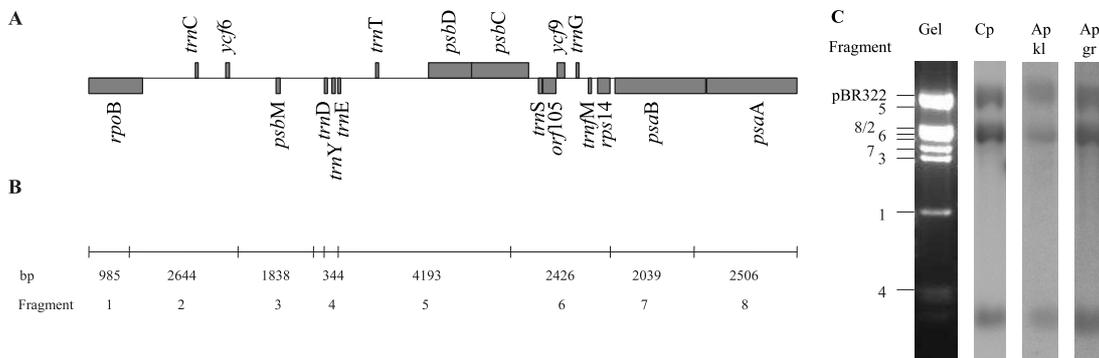


Abb. 41: Analyse der Transkriptzusammensetzung von Amyloplasten. (A) Schematische Darstellung der Gene auf dem pDNA - Fragment B20. (B) Restriktionskarte des Fragments nach Verdau mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Eco*RI in Relation zur Lage der Gene. Die Größe der Fragmente ist angegeben. (C) Restriktionsfragmente des pDNA - Subklons pTB20 nach gelelektrophoretischer Auftrennung (Gel) und die Autoradiogramme nach der Hybridisierung mit markierter RNA aus Chloroplasten (Cp), Amyloplasten aus Knollen mit einer durchschnittlichen Größe von 0,75 - 1 cm und 2 - 2,5 cm sind gezeigt. Die DNA-Fragmente sind entsprechend B numeriert.

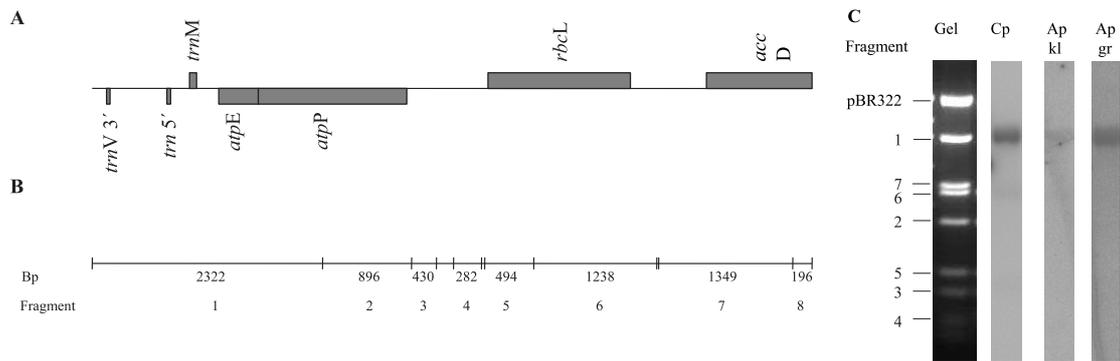


Abb. 42: Analyse der Transkriptzusammensetzung von Amyloplasten. (A) Schematische Darstellung der Gene auf dem pDNA - Fragment B27. (B) Restriktionskarte des Fragments nach Verdau mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Eco*RI in Relation zur Lage der Gene. Die Größe der Fragmente ist angegeben. (C) Restriktionsfragmente des pDNA - Subklons pTB27 nach gelelektrophoretischer Auftrennung (Gel) und die Autoradiogramme nach der Hybridisierung mit markierter RNA aus Chloroplasten (Cp), Amyloplasten aus Knollen mit einer durchschnittlichen Größe von 0,75 - 1 cm und 2 - 2,5 cm sind gezeigt. Die DNA-Fragmente sind entsprechend B nummeriert.

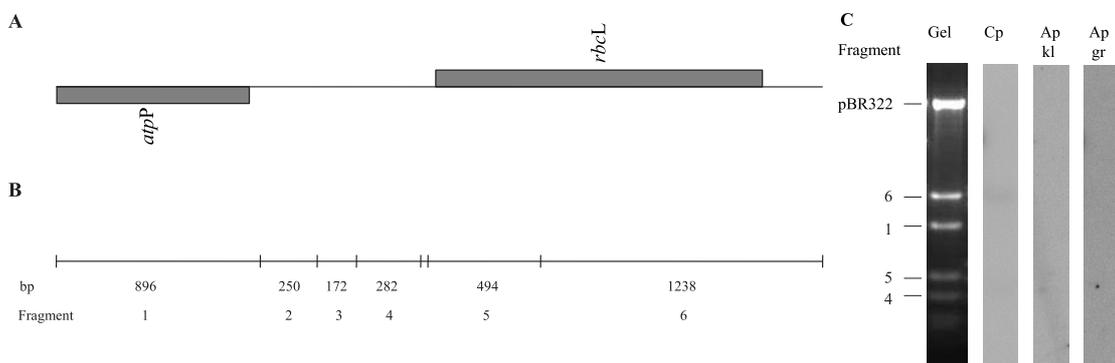


Abb. 43: Analyse der Transkriptzusammensetzung von Amyloplasten. (A) Schematische Darstellung der Gene auf dem pDNA - Fragment B29. (B) Restriktionskarte des Fragments nach Verdau mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Eco*RI in Relation zur Lage der Gene. Die Größe der Fragmente ist angegeben. (C) Restriktionsfragmente des pDNA - Subklons pTB29 nach gelelektrophoretischer Auftrennung (Gel) und die Autoradiogramme nach der Hybridisierung mit markierter RNA aus Chloroplasten (Cp), Amyloplasten aus Knollen mit einer durchschnittlichen Größe von 0,75 - 1 cm und 2 - 2,5 cm sind gezeigt. Die DNA-Fragmente sind entsprechend B nummeriert.

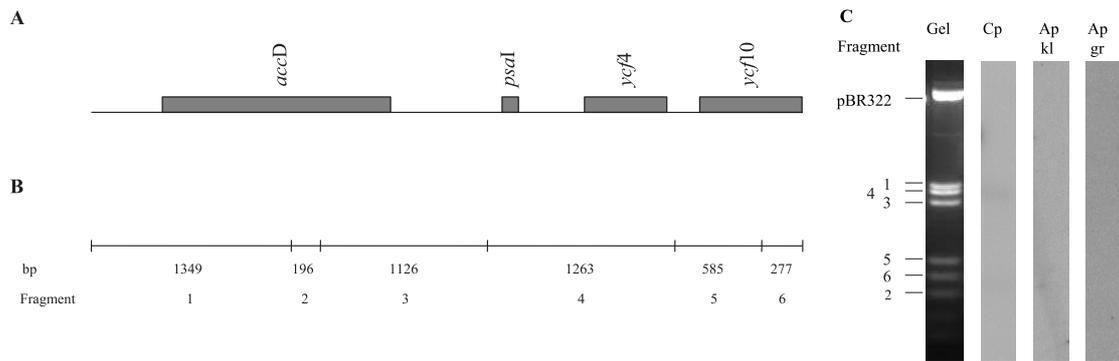


Abb. 44: Analyse der Transkriptzusammensetzung von Amyloplasten. (A) Schematische Darstellung der Gene auf dem pDNA - Fragment B22. (B) Restriktionskarte des Fragments nach Verdau mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Eco*RI in Relation zur Lage der Gene. Die Größe der Fragmente ist angegeben. (C) Restriktionsfragmente des pDNA - Subklons pTB22 nach gelelektrophoretischer Auftrennung (Gel) und die Autoradiogramme nach der Hybridisierung mit markierter RNA aus Chloroplasten (Cp), Amyloplasten aus Knollen mit einer durchschnittlichen Größe von 0,75 - 1 cm und 2 - 2,5 cm sind gezeigt. Die DNA-Fragmente sind entsprechend B nummeriert.

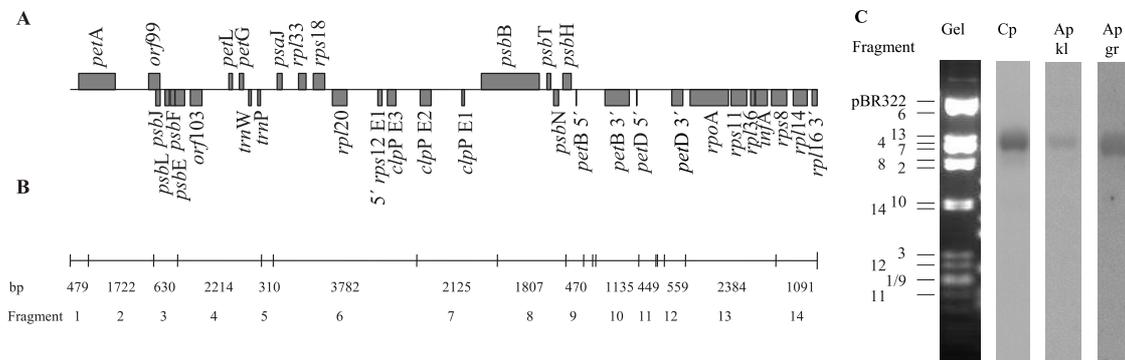


Abb. 45: Analyse der Transkriptzusammensetzung von Amyloplasten. (A) Schematische Darstellung der Gene auf dem pDNA - Fragment Ba1. (B) Restriktionskarte des Fragments nach Verdau mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Eco*RI in Relation zur Lage der Gene. Die Größe der Fragmente ist angegeben. (C) Restriktionsfragmente des pDNA - Subklons pTBa1 nach gelelektrophoretischer Auftrennung (Gel) und die Autoradiogramme nach der Hybridisierung mit markierter RNA aus Chloroplasten (Cp), Amyloplasten aus Knollen mit einer durchschnittlichen Größe von 0,75 - 1 cm und 2 - 2,5 cm sind gezeigt. Die DNA-Fragmente sind entsprechend B nummeriert.

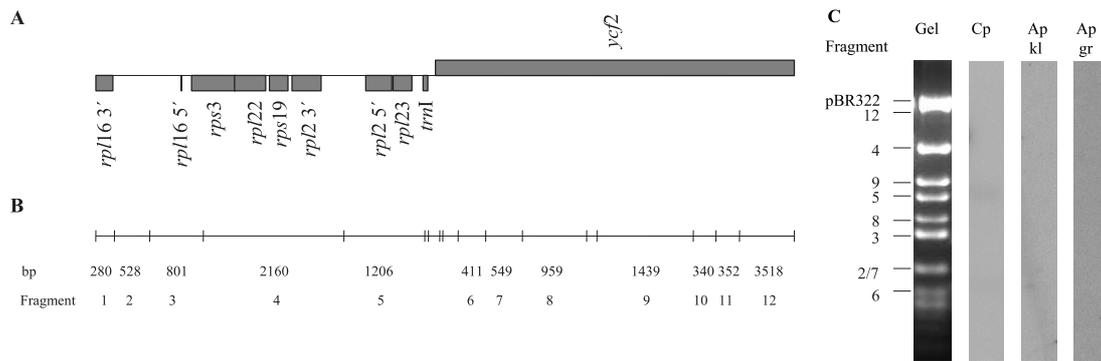


Abb. 46: Analyse der Transkriptzusammensetzung von Amyloplasten. (A) Schematische Darstellung der Gene auf dem pDNA - Fragment B13. (B) Restriktionskarte des Fragments nach Verdau mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Eco*RI in Relation zur Lage der Gene. Die Größe der Fragmente ist angegeben. (C) Restriktionsfragmente des pDNA - Subklons pTB13 nach gelelektrophoretischer Auftrennung (Gel) und die Autoradiogramme nach der Hybridisierung mit markierter RNA aus Chloroplasten (Cp), Amyloplasten aus Knollen mit einer durchschnittlichen Größe von 0,75 - 1 cm und 2 - 2,5 cm sind gezeigt. Die DNA-Fragmente sind entsprechend B nummeriert.

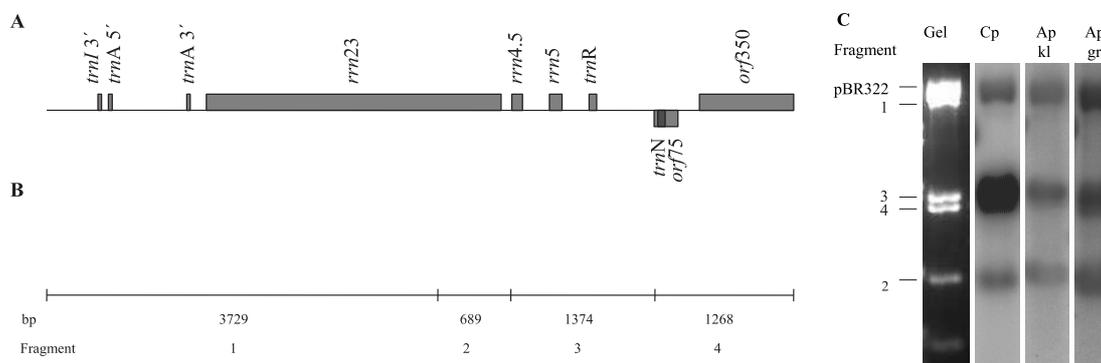


Abb. 47: Analyse der Transkriptzusammensetzung von Amyloplasten. (A) Schematische Darstellung der Gene auf dem pDNA - Fragment Ba5. (B) Restriktionskarte des Fragments nach Verdau mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Eco*RI in Relation zur Lage der Gene. Die Größe der Fragmente ist angegeben. (C) Restriktionsfragmente des pDNA - Subklons pTBa5 nach gelelektrophoretischer Auftrennung (Gel) und die Autoradiogramme nach der Hybridisierung mit markierter RNA aus Chloroplasten (Cp), Amyloplasten aus Knollen mit einer durchschnittlichen Größe von 0,75 - 1 cm und 2 - 2,5 cm sind gezeigt. Die DNA-Fragmente sind entsprechend B nummeriert.

Publikationen:

Falk, J., Brosch, M., Schäfer, A., Braun, S., Krupinska, K. (2005). Characterization of transplastomic tobacco plants with a plastid localized barley 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *J. Plant Physiol.* (162):738-742

Beiträge in Mitteilungsbanden von Tagungen

Brosch, M., Krause, K., Falk, J., Krupinska, K. (2003). Changes in transcription and transcript accumulation in amyloplasts during development of potato tubers (*Solanum tuberosum* L.). *Tagungsband des 7th International Congress of Plant Molecular Biology, Barcelona*

Brosch, M., Falk, J., Krupinska K. (2004). Different levels of gene expression in amyloplasts of potato tubers. *Mitteilungsband der Jahrestagung der Deutschen Botanischen Gesellschaft, Braunschweig*

Brosch, M., Falk, J., Krupinska K. (2005). Different levels of gene expression in amyloplasts of potato tubers. *Expert Meeting of the Research Training Programme on "Natural Antioxidants- Effects in Plants, Foods, Animals and Humans", Salza*

Falk, J., Brosch, M., Krupinska K. (2005). Characterization of transplastomic tobacco plants with a plastid localized barley 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *Expert Meeting of the Research Training Programme on "Natural Antioxidants- Effects in Plants, Foods, Animals and Humans", Salza*

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Mario Brosch
Geburtsdatum	24.05.1974
Geburtsort	Kirchheimbolanden
Eltern	Karlheinz Brosch, Helga Brosch (geb. Demmerle)
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulbildung

1980 - 1984	Johannes-Gutenberg-Grundschule Göllheim
1984 - 1994	Gymnasium Weiherhof am Donnersberg Bolanden Abitur: Juni 1994
Jul. 1994 - Sep. 1995	Zivildienst im Fachkrankenhaus Michaelshof Kirchheimbolanden

Studium

Okt. 1995 - März 1998	Grundstudium Diplom-Biologie an der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz
April 1998	Wechsel an die Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Okt. 2001	Abschluß des Studiums: Hauptfach: Zellbiologie Nebenfächer: Zoologie, Biochemie Zusatzfach: Biologische Meereskunde Diplomarbeit im Fach Zellbiologie Betreuer: Prof. Dr. K. Krupinska
seit Okt. 2001	Arbeiten zur Promotion im Fach Zellbiologie an der CAU Kiel unter Betreuung von Prof. Dr. K. Krupinska

Erklärung

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

Für die mündliche Prüfung wird die Form der Disputation gewählt.

Der Zulassung von Zuhörern/Zuhörerinnen bei der mündlichen Prüfung wird nicht widersprochen.

Kiel, den

Mario Brosch

Danksagung:

Als erstes möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Karin Krupinska für die interessante Themenstellung, sowie ihre stete Diskussionsbereitschaft und ihr Interesse an diesem Projekt bedanken. Vielen Dank!!!

Mein Dank gilt auch den Postdocs Jon, Kirsten und Bozena, die immer bereit waren mit mir über fachliche und praktische Probleme zu diskutieren.

Bei Anke, Annekatrin, Susanne und Ulrike möchte ich mich für die schöne Zusammenarbeit bedanken. Dabei gilt mein besonderer Danke Susanne und Ulrike, die mir eine große Hilfe in der Gewebekultur waren. Dr. Maria Mulisch danke ich für die Zusammenarbeit am TEM.

Mein herzlicher Dank gilt der Truppe im Doktorandenzimmer: Evelyn, Gaby, Lenard und besonders Isa, für die nette Zeit, die wir im und außerhalb des Labors verbracht haben. Weiterhin danke ich allen weiteren Mitgliedern und Ehemaligen der Arbeitsgruppe Krupinska, sowie den AGs Kempken, Sauter und Schulz-Friedrich für die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Für anregende Gespräche und einfach mal Frust ablassen danke ich allen Freunden, allen voran Andi, Wolfgang, Eve und Matthias, sowie den Mainzern Jungs und Mädels. Bei Geo möchte ich mich ganz besonders für die regen Diskussionen und die Literaturbeschaffung bedanken.

Schließlich möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Familie bedanken. Meinen Eltern danke ich für die Unterstützung und die aufbauenden Gespräche während meines Studiums. Meiner Schwester Rosi möchte ich dafür danken, daß sie immer eine offenes Ohr für alle großen und kleinen Probleme hatte. Steffen, Heike, Nina und Simon danke ich für die unbeschwerten Stunden, die wir zusammen verbracht haben.