

# **Identifizierung und Charakterisierung von Komponenten im transkriptionsaktiven Chromosom (TAC)**



## **Dissertation**

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

vorgelegt

dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von

**Jeannette Pfalz**

aus Dresden

Jena, Oktober 2004

**Gutachter:**

1. Prof. Ralf Oelmüller
2. PD Dr. Thomas Pfannschmidt
3. Prof. Karin Krupinska

Tag des Rigorosums: 24.12.05

Tag der öffentlichen Verteidigung: 06.12.04

## Abkürzungen

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	cirka
cDNA	<i>complementary</i> - Desoxyribonukleinsäure
CTP	Cytosin-5'-triphosphat
Δ	Deletionsmutante
dCTP	Desoxycytosin-5'-triphosphat
dGTP	Desoxyguanosin-5'-triphosphat
d.h.	das heißt
DNA	<i>desoxy ribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
DNase	Desoxyribonuklease
ECL	<i>enhanced chemical luminescence</i>
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
FG	Frischgewicht
<i>et al.</i>	et alii (Latein, und andere; hier: Mitarbeiter/innen)
g/l	Gramm pro Liter
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
h	Stunde
HEPES	(2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure)
IR	<i>inverted repeats</i> (gegenläufigen Sequenzwiederholungen)
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria-Bertani (Nährmedium für Bakterien)
M	Mol
μCi	Mikrocurie
μE	Mikroeinstein
μg	Mikrogramm
μmol	Mikromol
min	Minute
ml	Milliliter
μl	Mikroliter
mM	Millimol
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure)
mRNA	<i>messenger</i> -RNA
MS-Medium	Medium nach Murashige Skoog
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid + H <sup>+</sup>
NCBI	<i>National center for biotechnology information</i>
NEP	kernkodierte RNA-Polymerase ( <i>nuclear encoded polymerase</i> )
nm	Nanometer

---

o. g.	oben genannt
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEP	plastidenkodierte RNA-Polymerase ( <i>plastid encoded polymerase</i> )
pH	<i>pontus hydrogenii</i> (negativ dekadischer Logarithmus der Hydrogenium-Ionen-Konzentration)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PS	Photosystem
PVDF	Polyvinylidendifluorid
®	<i>registered</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäuren)
RNase	Ribonuklease
RT-PCR	Reverse Transkriptions-PCR
Upm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
s.	siehe
S	Svedberg (Sedimentationskonstante)
SDS	<i>sodium dodecyl sulfat</i>
sog.	so genannt
SSC	<i>sodium chloride sodium citrate</i>
Tab.	Tabelle
TBE	<i>tris buffered EDTA</i>
TBq	Terabequerel
TEMED	(N,N,N',N'-Tetramethyldiamin)
T-DNA	Transfer-DNA
™	Markenzeichen (Trade Mark)
tRNA	transfer-DNA
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UTP	Uridin-5'-triphosphat
UV	Ultraviolett
v. a.	vor allem
var.	Variante
v/v	Volumen pro Volumen
WT	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel

---

## Inhaltsverzeichnis

<b>I</b>	<b>Einleitung</b> .....	1
1	Ursprung photosynthetischer Organismen.....	1
2	Das Plastom.....	2
3	Die plastidäre Transkriptionsmaschinerie.....	4
4	Die plastidäre Genexpression.....	8
5	Zielstellung dieser Arbeit.....	9
<b>II</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	10
1	Materialien.....	10
1.1	Chemikalien.....	10
1.2	Enzyme und Fertigreagentien.....	10
1.3	Längenstandard für DNA und Proteine.....	11
1.4	Nukleotide und Oligonukleotide.....	11
1.5	Antikörper.....	13
1.6	Bakterienstämme, Klone und Plasmide.....	14
1.7	Pflanzenmaterial.....	14
1.8	Standardlösungen und Medien.....	15
2	Methoden.....	15
2.1	Handhabung und Kultivierung verwendeter Organismen.....	15
2.1.1	Anzucht und Vermehrung von Bakterien.....	15
2.1.2	Anzucht und Selektion von Pflanzen.....	16
2.2	Biochemische Analysen.....	16
2.2.1	Isolierung und Lyse von Chloroplasten.....	16
2.2.2	Gelfiltration an Sepharose 4B/2B.....	16
2.2.3	Heparin-SepharoseCL-6B-Chromatographie.....	18
2.2.4	Q-Sepharose-Chromatographie.....	19
2.2.5	Transkriptionsaktivitätstest.....	20
2.3	Probenvorbereitung und Massenspektrometrie.....	20
2.3.1	Probenvorbereitung.....	20

---

2.3.2	ESI-IONTRAP ( <i>Electrospray Ionization – Ion Trap</i> )- Massenspektrometrie.....	20
2.3.3	Analyse der massenspektrometrischen Daten.....	21
2.3.4	Proteinanalyse.....	21
2.4	Molekularbiologische Grundtechniken.....	22
2.5	DNA-Analysen.....	22
2.5.1	DNA-Isolation.....	22
2.5.2	Amplifizierung von DNA-Sequenzen mit der Polymerase- Kettenreaktion.....	22
2.5.3	Sequenzierung der DNA nach Sanger <i>et al.</i> (1977).....	23
2.6	RNA-Analysen.....	23
2.6.1	RNA-Isolation.....	23
2.6.2	<i>Northern</i> -Analysen.....	23
2.6.3	Reverse Transkription von RNA.....	23
2.6.4	<i>In organello - run-on</i> - Transkription.....	24
2.6.5	cDNA-Arrays.....	24
2.7	Proteinanalysen.....	25
2.7.1	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	25
2.7.2	Proteinextraktion.....	25
2.7.3	Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	26
2.7.4	Proteintransfer.....	26
2.7.5	Immunreaktion und Proteinnachweis.....	26
2.8	Elektronenmikroskopische Aufnahmen.....	26
<b>III</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	27
1	Proteomanalyse des TAC-Komplexes.....	27
1.1	Anreicherung einer transkriptionsaktiven Fraktion.....	27
1.2	Massenspektrometrische Analyse der TAC-Komponenten.....	30
1.2.1	Identifizierung der TAC-Proteine nach Gelfiltrationschromatographie.....	30
1.2.2	Identifizierung der TAC-Proteine nach Affinitäts- bzw. Ionenaustausch-Chromatographie.....	41

---

1.2.3	Identifizierung der TAC-Proteine nach SDS-PAGE.....	41
1.3	Datenbankanalysen putativer Proteine.....	43
2	Charakterisierung von Komponenten des TAC.....	50
2.1	Identifizierung von Mutanten.....	50
2.1.1	Phänotypische Charakterisierung der Mutanten.....	50
2.1.2	Segregationsanalysen der T-DNA-Linien.....	52
2.1.3	Ultrastrukturelle Analysen der Chloroplasten.....	53
2.1.4	Genotypische Analyse der T-DNA-Mutanten.....	54
2.1.5	Expression der genspezifischen mRNAs in den <i>knock-out</i> - Linien.....	56
2.2	Strukturanalysen der Proteine.....	57
2.3	Expression der genspezifischen mRNAs in verschiedenen Geweben von <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	58
2.4	Expressionsmuster plastidärer Gene im <i>steady state</i> .....	60
2.4.1	Akkumulationsanalysen plastidärer Transkripte mittels <i>Northern-blots</i> .....	60
2.4.2	Akkumulationsanalysen plastidärer Transkripte mittels <i>Macroarrays</i> .....	62
2.5	Analysen der Transkriptionsraten plastidärer Gene mittels <i>run-on</i> -Transkription.....	65
2.6	<i>Immuno-blot</i> -Analysen.....	66
<b>IV</b>	<b>Diskussion</b> .....	69
1	Massenspektrometrische Analyse des TAC-Komplexes aus <i>Arabidopsis</i> - und <i>Sinapis</i> -Chloroplasten.....	69
1.1	Identifizierung neuer TAC-Proteine.....	69
1.2	RNA-Polymerasen und Transkriptionsfaktoren im TAC.....	73
1.3	Proteinkomposition der plastidären RNA-Polymerase im TAC.....	74
1.4	Unterschiede der TAC-Proteinkomposition von <i>Arabidopsis thaliana</i> und <i>Sinapis alba</i> .....	75
2	Identifizierung und Charakterisierung der Mutanten.....	75

**V Zusammenfassung**..... 80

**VI Literaturverzeichnis**..... 83

# I. Einleitung

## 1 Ursprung und Funktion der Plastiden

Pflanzen zeichnen sich durch ihre Fähigkeit zur Photosynthese aus. Damit spielen sie neben Bakterien eine wichtige Rolle als Primärproduzenten organischer Substanzen. Die Photosynthese, bei der die Konvertierung von Lichtenergie in chemische Energie sowie die Reduktion von CO<sub>2</sub> zu Kohlenhydraten erfolgt, findet in den Chloroplasten statt. Neben Chloroplasten gibt es weitere Plastidentypen, die wichtige Funktionen übernehmen: Etioplasten; stärkesynthetisierende und -speichernde Amyloplasten in den Wurzeln und Samen sowie Chromoplasten für die Akkumulation von Carotenoiden in den Früchten. Diese gewebe- und organspezifischen Plastiden entwickeln sich aus undifferenzierten Proplastiden. Durch umwelt- und entwicklungsbedingte Änderungen können sie ineinander überführt werden. Ein gut untersuchtes Beispiel ist die Photokonvertierung der Etioplasten in Chloroplasten. Die dabei ablaufende Differenzierung geht mit Änderungen des Genexpressionssystems, der Proteinausstattung sowie der Ultrastruktur der Plastiden einher (Herrmann *et al.*, 1992 und 2003). So sind in Etioplasten Vorstufen der Thylakoidmembranen in Form eines kristallinen Prolamellarkörpers angehäuft, die sich unter Einwirkung von Licht zu einem ausgedehnten Thylakoidmembransystem der Chloroplasten entwickeln.

Der evolutive Ursprung von Plastiden kann durch die Endosymbiontentheorie beschrieben werden. Danach haben sich Plastiden und Mitochondrien, durch eine mehrfache und unabhängige phagozytotische Inkorporation freilebender Bakterien, aus Urkaryonten evoluiert (erstmalig von Schimper erwähnt, 1883; Mereschowsky, 1905; Herrmann, 1997; Martin und Müller, 1998a). Mitochondrien haben wahrscheinlich ihren Ursprung in aeroben Purpurbakterien ( $\alpha$ -Proteobacteria [Andersson *et al.*, 1998; Gray *et al.*, 1999; Emelyanov *et al.*, 2003]). Für Chloroplasten nimmt man an, dass sie sich aus ursprünglichen, photosynthetisch aktiven Cyanobakterien entwickelt haben (Martin *et al.*, 1998b; McFadden, 2001). Im Zuge des Evolutionsprozesses verloren die Symbionten einen Teil ihres genetischen Materials, eine weitaus größere Anzahl von Genen wurde ins Kerngenom integriert (Kurland und Andersson, 2000; Adams und Martin, 2003; Palmer, 2003; Stegemann *et al.*, 2003; Richly und Leister, 2004; Timmis *et al.*, 2004). Dementsprechend umfasst die

Kodierungskapazität des Plastoms höherer Pflanzen ca. 120 Gene (bis zu 300 bei Algen), während das Proteom aus schätzungsweise 5000 Proteinen besteht (Abdallah *et al.*, 2000; Rujan und Martin, 2001; Martin *et al.*, 2002). Zu den organelleigenen Genen der Plastiden gehören hauptsächlich Gene, die für photosynthetische Membrankomplexe und für Komponenten der Transkriptions- bzw. Translationsmaschinerie kodieren (Sugiura, 1992). Die verbleibenden Proteine sind kernkodiert und werden nach Translation im Cytoplasma in die Plastiden transportiert (Cline und Henry, 1996; Schnell, 2000). Dazu gehören Gene, die für regulatorische Faktoren der plastidären Genexpression kodieren (Goldschmidt-Clermont, 1998; Barkan und Goldschmidt-Clermont, 2000; Gray *et al.*, 2003; Nickelsen *et al.*, 2003).

## 2 Das Plastom

Nach bisheriger Auffassung liegt die Plastiden-DNA (ptDNA) als doppelsträngiges, zirkuläres Molekül vor (Kolodner und Tewari, 1972; Herrmann *et al.*, 1975). Jedoch führten neuste Erkenntnisse der ptDNA-Form zur Revidierung dieser Ansicht. So konnte anhand von Pulsfeldelektrophoreseexperimenten, Restriktionsfragmentanalysen und Fluoreszenzmikroskopie gezeigt werden, dass der größte Teil der ptDNA in linearer und komplex verzweigter Form vorliegt (Bendich, 2004; Oldenburg und Bendich, 2004). Abhängig vom Entwicklungsstadium und vom Gewebetyp sind pro Plastid ca. 50 - 300 DNA-Kopien enthalten (Bendich, 1987; Sugiura, 1992), wobei während der Entwicklung eine starke Reduktion des Polyploidiegrades bis hin zum Fehlen der ptDNA erfolgen kann (Lüttke und Bonotto, 1981; Baumgartner *et al.*, 1998; Rowan *et al.*, 2004).

Die ptDNA liegt in mehreren Molekülen zu Protein-DNA-Komplexen, den sog. Nukleoiden, organisiert vor (Kuroiwa und Zuzuki, 1981; Nemoto *et al.*, 1991, Sato *et al.*, 2003). Das Proteinmuster isolierter Nukleoide aus Chloroplasten höherer Pflanzen lässt auf 20 - 50 Proteine schließen (Nemoto *et al.*, 1991; Yurina *et al.*, 1995). Jedoch konnten bislang nur einige wenige Proteine in Nukleoiden aus Chloroplasten höherer Pflanzen identifiziert werden: PEND aus Erbse (Sato *et al.*, 1993; Sato und Ohta, 2001), CND41 aus Tabak (Nakano *et al.*, 1997; Kato *et al.*, 2004), PDC68 aus Sojabohne (Cannon *et al.*, 1999; Chi-Ham *et al.*, 2002) sowie das kürzlich in *Arabidopsis thaliana* charakterisierte MFP1 (Jeong *et al.*, 2003; 2004). Im Plastom der Cryptomonade *Guillardia theta* (*Cryptomonas*  $\Phi$ ), einer einzelligen Alge, deren evolutiver Ursprung einem sekundären Endosymbioseereignis zuzuordnen ist, lokalisierten Wang und Liu (1991) das Gen *hlpA*, das für ein histonähnliches Protein kodiert.

Mit der Charakterisierung des plastidenkodierten HC-Proteins (*histon-like protein of chloroplast*) in *Cyanidioschyzon merolae* erfolgte der Nachweis, dass histonähnliche Proteine an der Organisation der Chloroplastennukleoiden beteiligt sind (Kobayashi *et al.*, 2002).

Die Plastomgröße variiert bei verschiedenen Arten zwischen 120 und 300 kb. Dabei zeigen insbesondere photosynthetisch inaktive Pflanzen eine starke Reduktion des Plastidengenoms (z. B. *Epifagus virginiana*; dePamphilis und Palmer, 1990). Charakteristisch für ptDNA sind ihre gegenläufigen Sequenzwiederholungen (IR, *inverted repeats*), die eine große (LSC) und kleine (SSC) Einzelkopieregion voneinander trennen. Ausnahmen von dieser Struktur sind v. a. bei Leguminosen und Koniferen zu finden (Link, 1996). Die IR-Regionen enthalten neben Genen für tRNAs und wenigen Proteinen hauptsächlich Sequenzen für rRNAs. Dagegen kodieren die beiden Einzelkopieregionen hauptsächlich für Proteine und zahlreiche tRNAs. Die variierenden Plastomgrößen einzelner Arten sind meistens auf die Länge der IR-Regionen zurückzuführen (Maier *et al.*, 1995). In *Euglena gracilis* und *Porphyras purpurea* fehlen IR-Regionen. Hier liegen die tRNAs in einer Tandemanordnung hintereinander (Hallick *et al.*, 1993; Reith und Munholland, 1995).

Plastomanalysen verschiedener, nicht parasitärer Pflanzen (z. B. *Nicotiana tabacum* [Shinozaki *et al.*, 1986], *Oryza sativa* [Hiratsu *et al.*, 1989], *Zea mays* [Hu und Bogorad, 1990]) und Algen (z. B. *Porphyras purpurea* [Reith und Munholland, 1993; Maier *et al.*, 1995], *Chlamydomonas reinhardtii* [Fong und Surczycki, 1992]) führten zur Identifizierung von *rpo*-Genen, die Untereinheiten der plastideneigenen Polymerase (PEP) kodieren. Die von *rpoA*, *rpoB* und *rpoC* abgeleiteten Proteinsequenzen lassen große Homologien zu den  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\beta'$ -Untereinheiten des eubakteriellen Enzyms erkennen. Im Laufe der Evolution hat das *rpoC*-Gen der Eubakterien in höheren und niederen Pflanzen eine Genduplikation in *rpoC1* ( $\beta'$ ) und *rpoC2* ( $\beta''$ ) erfahren, mit Ausnahme von *Chlamydomonas reinhardtii*. Bei dieser einzelligen Grünalge wurde das *rpoB*-Gen zu *rpoB1* und *rpoB2* dupliziert (Fong und Surczycki, 1992).

Wie in Prokaryoten liegt die Mehrzahl der Plastidengene in polyzistronischen Transkriptionseinheiten vor (Sugita und Sugiura, 1996). Dabei können auf einem Operon Gene lokalisiert sein, die für Proteine unterschiedlicher Funktion kodieren. Umgekehrt sind Gene, die für Untereinheiten eines Proteinkomplexes kodieren, auf unterschiedlichen Operonen innerhalb des Plastoms verteilt. Im Gegensatz zu Prokaryoten wird die prä-mRNA

posttranskriptionell in mono- und oligozistronische RNA prozessiert (Barkan 1988; Sugita und Sugiura, 1996; Barkan und Goldschmidt-Clermont, 2000). Ein weiteres Charakteristikum für Plastidengene ist das Auftreten nichtkodierender Intron-Bereiche innerhalb eines Genes, während in ihren prokaryotischen Vorfahren Intronbereiche nur selten vorkommen (Lambowitz *et al.*, 1999; Toro, 2003). Die Introns werden vor der Translation durch unterschiedliche Spleißmechanismen entfernt (Saldanha *et al.*, 1993; Bonen und Vogel, 2001; Perron *et al.*, 2004).

### 3 Die plastidäre Transkriptionsmaschinerie

Das Plastidengenom wird von mindestens zwei DNA-abhängigen RNA-Polymerasetypen transkribiert, die unterschiedlichen phylogenetischen Ursprungs sind. Neben der plastidenkodierten, multimeren RNA-Polymerase PEP (*plastid encoded polymerase*), die auf Grund ihrer strukturellen und funktionellen Eigenschaften den eubakteriellen RNA-Polymerasen sehr ähnelt, sind zusätzlich kernkodierte RNA-Polymerasen (NEP, *nuclear encoded polymerase*) aktiv. Letztere zeigen Sequenzhomologie zu RNA-Polymerasen der Mitochondrien in Hefen und der Bakteriophagen T7, T3 und Sp6. Gene, die für Phagenpolymerasen kodieren, konnten in verschiedenen höheren Pflanzen gefunden werden (Weihe *et al.*, 1997; Hedtke *et al.*, 1997 und 2002; Young *et al.*, 1998, Ikeda und Gray, 1999). Im Genom von *Arabidopsis thaliana* sind drei Gene (*RpoT;1*, *RpoT;2* und *RpoT;3*) identifiziert worden, die für RNA-Polymerasen vom Phagentyp kodieren. *RpoT;1* ist in Mitochondrien und *RpoT;3* in Chloroplasten aktiv (Hedtke *et al.*, 1997; Liere *et al.*, 1999 und 2004). Importversuchen zu Folge wird die kernkodierte Polymerase *RpoT;2* sowohl in Mitochondrien als auch in Chloroplasten transportiert (Hedtke *et al.*, 2000). Kürzlich konnte in Spinatchloroplasten Transkriptionsaktivität zweier kernkodierten RNA-Polymerasen, NEP-1 und NEP-2 bezeichnet, nachgewiesen werden (Bligny *et al.*, 2000). Die Entstehung der plastidären Phagenpolymerase lässt sich wahrscheinlich auf ein Genduplikationsereignis der mitochondrialen Phagenpolymerase zurückführen (Hedtke *et al.*, 1997).

Die Existenz einer kernkodierten Polymerase wurde bereits durch Untersuchungen mit der parasitären Pflanze *Epifagus virginiana* postuliert, in der trotz des Fehlens des *rpoBC*-Operons plastidäre Transkripte nachgewiesen werden konnten (Morden *et al.*, 1991). Weiterhin belegen Arbeiten mit ribosomenfreien Plastiden der Gerstenmutante *albostrians*

(Hess *et al.*, 1993; Falk *et al.*, 1993) sowie mit *rpo*-Deletionsmutanten von Tabak (Allison *et al.*, 1996; Hajdukiewicz *et al.*, 1997), dass eine kernkodierte Polymerase an der plastidären Transkription beteiligt ist. Obwohl in beiden Fällen keine plastideneigenen RNA-Polymerasen aktiv waren, konnte Transkriptionsaktivität in den Chloroplasten gemessen werden. Durch die Isolierung von cDNAs, die Homologien zu der mitochondrialen RNA-Polymerase vom Bakteriophagentyp aufweisen und über plastidendirigierende Transitsequenzen verfügen, erfolgte die Bestätigung einer zusätzlichen kernkodierten Polymerase in den Chloroplasten (Weihe *et al.*, 1997; Hedtke *et al.*, 1997, 2000).

Transkriptions- und Promotorstudien mit *rpo*-Deletionsmutanten von Tabak führten zu der Annahme, dass die NEP ‚*housekeeping*‘-Gene transkribiert, während PEP hauptsächlich für die Transkription von Photosynthesegenen verantwortlich ist (Hajdukiewicz *et al.*, 1997; Hess und Börner, 1999). Nachfolgende Untersuchungen mit diesen PEP-defizienten Tabakpflanzen zeigten, dass die NEP grundsätzlich zur Transkription des gesamten Plastidengenoms fähig ist. Damit erfolgt keine ausschließliche selektive Promotornutzung. Vielmehr scheint das Transkriptionsmuster dieser Mutanten von der Stabilität der Transkripte abhängig zu sein (Krause *et al.*, 2000; Legen *et al.*, 2002). Neueste Erkenntnisse bestätigen, dass die mRNA-Stabilität variiert, in Abhängigkeit von welcher RNA-Polymerase die Transkripte synthetisiert werden (Cahoon *et al.*, 2004).

Die strukturelle Verwandtschaft der PEP zu der eubakteriellen RNA-Polymerase konnte am Beispiel der plastidären RNA-Polymerase aus Spinat immunologisch nachgewiesen werden (Lerbs-Mache *et al.*, 1988). In Bakterien initiiert das *core*-Enzym ( $\alpha\beta\beta'$ ) eine unspezifische Transkription, während für eine spezifische Promotorselektion sowie Transkriptionsinitiation das *holo*-Enzym ( $\alpha\beta\beta'\sigma$ ) benötigt wird (Ishihama, 1988). Dieses entsteht durch die Anlagerung von Sigmafaktoren an das *core*-Enzym. In den Chloroplasten sind ebenfalls Transkriptionsfaktoren enthalten, die funktionell den Sigmafaktoren der Bakterien gleichen. Die korrespondierenden Gene sind jedoch im Kerngenom lokalisiert. In den letzten Jahren wurden von verschiedenen Organismen cDNAs kloniert, deren Produkte Sequenzhomologien zu konservierten Domänen der  $\sigma^{70}$ -Faktoren aus *E. coli* zeigen. In *Arabidopsis thaliana* konnten sechs cDNAs, die für Sigmafaktoren kodieren, isoliert werden. Drei weitere charakterisierte Transkriptionsfaktoren sind die sog. *sigma-like-factors* (SLF67, SLF52 und SLF29) aus Senf. Diese initiieren zusammen mit dem *core*-Enzym aus *E. coli* die *in vitro*-

Transkription von *psbA*, *trnQ* und *rps16* (Tiller *et al.*, 1991). Sigmafaktoren werden abhängig vom Licht entwicklungs- und gewebespezifisch exprimiert und sind vermutlich für die Erkennung der unterschiedlichen Promotorelemente verantwortlich. Indem die spezifische Transkriptionsaktivität der PEP durch das Mitwirken nukleärer Transkriptionsfaktoren bzw. Sigmafaktoren bestimmt wird, übernimmt der Kern die Vermittlung der PEP-abhängigen Transkription (Allison, 2000).

Übereinstimmend mit der Existenz unterschiedlicher RNA-Polymerasen, weist das Plastidengenom multiple Promotorelemente auf. Typische, von der plastidenkodierten Polymerase genutzte Promotorelemente zeigen Ähnlichkeiten zu konservierten Sequenzmotiven der  $-10'$  und  $-35'$  Region prokaryotischer Promotoren. In Analogie zu der Mitochondrienpolymerase zeigen die meisten NEP Promotoren die Konsensussequenz YRTA (Typ Ia). In angrenzenden Bereichen der YRTA-Sequenz ist in manchen NEP-Promotoren das GAA-Box-Motiv (Typ Ib) vorzufinden (Kapoor und Sugiura, 1999; Liere *et al.*, 2004). Schließlich gibt es eine dritte Klasse von NEP-Promotoren, die über eine sog. *non-consensus*'-Sequenz (Typ II) verfügen (Kapoor *et al.*, 1997; Sriraman *et al.*, 1998). Entsprechend dem Vorhandensein von Promotorelementen innerhalb einer Transkriptionseinheit erfolgte eine Einteilung in drei Genklassen: (i) Gene, die ausschließlich von der PEP [Klasse I] oder (ii) NEP [Klasse II] transkribiert werden und (iii) Gene, die von beiden RNA-Polymerasen [Klasse III] gelesen werden können (Hajdukiewicz *et al.*, 1997). Vertreter aller drei Klassen können als mono- oder polyzistronische Transkriptionseinheiten gebildet werden.

Die plastidäre RNA-Polymerase konnte in zwei unterschiedlichen, transkriptionsaktiven Chloroplastenfraktionen immunologisch nachgewiesen werden: im TAC (*transcriptionally active chromosome*), einem hochmolekularen DNA/RNA-Protein-Komplex, sowie in einer löslichen Fraktion, der sRNAP (*soluble RNA polymerase*). Letztere entspricht der multimeren PEP. Das TAC ist mit plastidären Membranen assoziiert und vermag die endogen gebundene DNA zu transkribieren, wobei nur die *in vivo* initiierten Transkripte verlängert werden. Dagegen ist die *in vitro*-Transkriptionsaktivität der sRNAP von exogener DNA abhängig (Igloi und Kössel, 1992; Krause *et al.*, 2000).

Das TAC verschiedener Organismen wurde vielfach durch Gelfiltrationschromatographie isoliert (Rushlow und Hallick, 1982), wobei die spezifische Aktivität der TAC-Fraktionen von bestimmten Reinigungsschritten abhängig ist (Suck *et al.*, 1996; Krause *et al.*, 2000). Aus

*run-on*-Experimenten mit TAC-Fraktionen aus *Euglena gracilis* geht hervor, dass das TAC vorzugsweise rRNAs transkribiert (Rushlow *et al.*, 1980), während in höheren Pflanzen außerdem die Transkription von plastidären mRNAs erfolgt (Reis und Link, 1985; Krupinska und Falk, 1994).

TAC-Fraktionen aus Proplastiden, Chloroplasten und Etioplasten zeigen eine abweichende Proteinzusammensetzung (Reis und Link, 1985; Suck *et al.*, 1996). Dies könnte darauf deuten, dass der TAC-Komplex in seiner Zusammensetzung als dynamischer DNA/RNA-Protein-Komplex vorliegt und somit durch Änderung der Proteinkomposition eine differentielle Transkription plastidärer Gene ermöglicht. Im TAC aus Chloroplasten sind schätzungsweise 50 - 60 Proteine enthalten. Darunter befinden sich neben Untereinheiten der PEP weitere DNA-bindende Proteine, wie aus DNA-Bindungsstudien mit TAC-Proteinen aus Senfchloroplasten hervorgeht (Bülow *et al.*, 1987). Bislang konnten zwei PEP-Untereinheiten im TAC immunologisch nachgewiesen werden (Suck *et al.*, 1996; Krause und Krupinska, 2000). Jüngste immunologische Analysen führten zur Identifizierung einer weiteren TAC-Komponente, dem kernkodierte ET1-Protein. Auf Grund seiner Homologie zum nukleären TFIIS-Protein, wird vermutet, dass ET1 im TAC als Elongationsfaktor fungiert. Gleichzeitig konnte in *etl-R*-Pflanzen gezeigt werden, dass die relative Transkriptionsaktivität des TAC-Komplexes von ET1 abhängig ist, während keine qualitativen Änderungen des Transkriptionsmusters im Vergleich zum WT erfolgen (da Costa e Silva *et al.*, 2004). Aus Untersuchungen von TAC-Fraktionen ribosomendefizienter Pflanzen wurde geschlossen, dass im TAC mindestens eine kernkodierte Polymerase enthalten ist (Suck *et al.*, 1996). Jedoch konnte diese bislang nicht nachgewiesen werden.

Abgesehen vom TAC wurden aus Senf zwei multimere Formen der plastideneigenen RNA-Polymerase isoliert, die beide in der löslichen Plastidenfraktionen zu finden sind. Diese als Enzym A (PEP-A) und B (PEP-B) bezeichneten RNA-Polymerasen zeigen strukturelle sowie funktionelle Unterschiede. PEP-B ist gegenüber Rifampicin sensitiv und besteht aus 4 Untereinheiten, die ihrem Molekulargewicht zu Folge, den Genprodukten von *rpoA*, *rpoB*, *rpoC1* und *rpoC2* anderer Organismen entsprechen. Bei der PEP-A handelt es sich um einen rifampicinresistenten Multiproteinkomplex bestehend aus 13 - 15 Untereinheiten. Während PEP-B hauptsächlich in Etioplasten und sich differenzierenden Plastiden vorkommt, ist die PEP-A-Aktivität in den Chloroplasten dominierend. Beide Formen unterscheiden sich hinsichtlich der Transkriptionsinitiation. Offensichtlich unterliegt die PEP-B einer

entwicklungsabhängigen Konvertierung durch Rekrutierung zusätzlicher Proteine zu PEP-A (Pfannschmidt und Link, 1994; 1997).

#### 4 Die plastidäre Genexpression

Die getrennte Kompartimentierung genetischer Information erfordert eine koordinierte Steuerung der nukleären und plastidären Genexpression (Gruissem, 1989; Goldschmidt-Clermont, 1998; Gray *et al.*, 2003). Letztere wird durch Kontrollmechanismen, die von Umweltbedingungen und dem Entwicklungsalter der Pflanzen abhängig sind, auf der Ebene der Transkription, RNA-Prozessierung, RNA-Stabilität, Translation sowie durch Modifizierung und Assemblierung der Genprodukte geregelt (Sugita und Sugiura, 1996; Wollman *et al.*, 1999; Allison, 2000; Barkan und Goldschmidt-Clermont, 2000; Rochaix, 2001; Nickelsen *et al.*, 2003). Dabei übernimmt der Zellkern wichtige regulatorische Funktionen. Ein weiterer, nicht unwesentlicher Aspekt ist die von Plastiden ausgehende Kontrolle der Genexpression im Kern (Brown *et al.*, 2001; Surpin und Chory, 2001; Pfannschmidt *et al.*, 2003). Auch Mitochondrien spielen bei der interorganellaren Kommunikation eine wichtige Rolle (Padmasree *et al.*, 2002).

An der plastidären Genexpression ist eine Vielzahl kernkodierter Faktoren beteiligt. So sind für die spezifische Transkriptionsaktivität der plastidären RNA-Polymerase kernkodierte Transkriptionsfaktoren notwendig (Allison, 2000). Auch die NEP-Aktivität unterliegt zellspezifischen Änderungen (Bligny *et al.*, 2000; Cahoon *et al.*, 2004; Emanuel *et al.*, 2004). Inwiefern die NEP zusätzliche Faktoren benötigt, ist noch unklar.

In entwickelten Chloroplasten sind posttranskriptionelle Prozesse wichtige Kontrollpunkte der plastidären Genexpression. Dies betrifft v. a. die endonukleolytische Spaltung von inter-zistronischen Regionen, das Spleißen von Introns, die Prozessierung von 5'- und 3'-Enden und die RNA-Stabilität (Goldschmidt-Clermont, 1998; Barkan und Goldschmidt-Clermont, 2000; Rochaix, 2001; Gray *et al.*, 2003; Nickelsen *et al.*, 2003). Neue Studien lassen vermuten, dass v. a. PPR-Proteine eine zentrale Rolle im RNA-Metabolismus einnehmen (Lurin *et al.*, 2004; Nakamura *et al.*, 2004; Yamazaki *et al.* 2004). Charakteristisch für diese Proteine sind ihre Sequenzwiederholungen (PPR, *pentatricopeptide repeat*) von 35 Aminosäuren, die in einer Tandemanordnung vorliegen (Small und Peeters, 2000). Das *Arabidopsis*-Genom enthält ca. 450 Mitglieder dieser Genfamilie, während in Prokaryoten

bisher keine PPR-Proteine bekannt sind (Lurin *et al.*, 2004). Gut charakterisierte PPR-Proteine sind CRP1 und PGR3. Beide sind an posttranskriptionellen Prozessen beteiligt. So konnte mit Hilfe von Mutantanalysen gezeigt werden, dass CRP1 für die Prozessierung (Fisk *et al.*, 1999) und PGR3 für die Stabilität (Yamazaki *et al.* 2004) spezifischer mRNAs verantwortlich ist. Beide scheinen auch für die Translation unerlässlich zu sein.

Ein weiterer bedeutender Prozessierungsschritt ist die Edierung, bei der ein Nukleotidenaustausch, in den meisten Fällen Cytidin-Uridin-Substitutionen, an spezifischen Positionen innerhalb der Transkripte erfolgt. Dadurch werden hauptsächlich Kodons konservierter Aminosäuren wiederhergestellt, oder aber auch Start- und Stoppkodons gebildet sowie Stoppkodons in aminosäurekodierende Kodons umgewandelt (Maier *et al.*, 1996, Wakasugi *et al.*, 1996; Gott und Emeson, 2000). Zusätzlich scheinen Sequenzveränderungen in intergenischen Bereichen für die Translation von Transkripten von Bedeutung zu sein (Kudla und Bock, 1999; Drescher *et al.*, 2000). Auch bei Edierungsprozessen spielen nukleär kodierte Faktoren eine wichtige Rolle (Hirose und Sugiura, 2001; Miyamoto *et al.*, 2004).

## 5 Zielstellung dieser Arbeit

Plastiden sind semiautonome Organellen pflanzlicher Zellen, die neben rRNAs und tRNAs auch Proteine des Photosyntheseapparates sowie für Komponenten ihrer eigenen Transkriptions- und Translationsmaschinerie kodieren. Eine zentrale Rolle bei der plastidären Genexpression spielt die Koordination der Transkription. Biochemischen Untersuchungen zu Folge sind daran zahlreiche kernkodierte Faktoren beteiligt, von denen einige in einem hochmolekularen DNA/RNA-Protein-Komplex, dem TAC (*transcriptionally active chromosome*) vorliegen. Das Anliegen dieser Arbeit bestand darin, die TAC-Proteinzusammensetzung massenspektrometrisch zu analysieren. Darüber hinaus bestand großes Interesse an der funktionellen Charakterisierung dieser Proteine. Dazu wurde ein Ansatz gewählt, bei dem mit *knock-out*-Mutanten gearbeitet werden sollte. Über die Sichtung einer Mutantenpopulation, mit T-DNA-Insertionen in entsprechenden Genen, sollten zunächst Mutanten identifiziert und schließlich charakterisiert werden.

## II. Material und Methoden

### 1 Materialien

#### 1.1 Chemikalien

In vorliegender Arbeit verwendete Chemikalien in p.a. Qualität wurden von folgenden Firmen bezogen:

- Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
- Biomol Feinchemikalien, Hamburg
- Carl Roth GmbH, Karlsruhe
- Gibco BRL, Karlsruhe
- ICN Biomedicals GmbH, Eschwege
- Merck Eurolab, Darmstadt
- Serva Feinbiochemika, Heidelberg
- Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

#### 1.2 Enzyme und Fertigreagentien

*Enzyme:*

- |  |                                   |
|--|-----------------------------------|
| - DNA-Polymerase                                     |                                   |
| - DyNAzyme™ EXT DNA Polymerase                       | Finnzymes, Espoo (Finnland)       |
| - DyNAzyme™ II DNA Polymerase                        | Finnzymes, Espoo (Finnland)       |
| - DNase  | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim  |
| - Klenow   | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim  |
| - Restriktionsendonukleasen                          | MBI-Fermentas GmbH, St. Leon-Roth |
| - RevertAid™ H Minus M-MuLV Reverse<br>Transkriptase | MBI-Fermentas GmbH, St. Leon-Roth |
| - RNase  | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim  |
| - T4-DNA Ligase                                      | Promega GmbH, Mannheim            |
| - Trypsin  | Promega GmbH, Mannheim            |

*Fertigreagensätze:*

- |  |                                      |
|--|--------------------------------------|
| - QIAGEX II Agarose Gel Extraction Kit   | QIAGEN                               |
| - Random Primed Labelling Kit  | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim     |
| - Thermo Sequenase Fluorescent Labelled <i>Primer</i> Cycle Sequencing Kit with 7-deaza-dGTP | Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg |

## 1.3 Längenstandard für DNA und Proteine

- |   |                                      |
|---|--------------------------------------|
| $\lambda$ -DNA C1857 Sam7                   | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim     |
| LMW-Marker für SDS-PAGE und Proteintransfer | Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg |

## 1.4 Nukleotide und Oligonukleotide

*Nukleotide:*

- |   |                                      |
|---|--------------------------------------|
| - dNTP  | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim     |
| - NTP   | MBI-Fermentas GmbH, St. Leon-Rot     |
| - $\alpha$ - <sup>32</sup> P-dCTP (10 TBq/mmol) | Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig |
| - $\alpha$ - <sup>32</sup> P-UTP (10 TBq/mmol)  | Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig |
| - $\alpha$ - <sup>3</sup> H-UTP (10 TBq/mmol)   | Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg |

*Oligonukleotide:*

Bezeichnung	Sequenz	Hersteller
<b>Oligonukleotide zum Sequenzieren</b>		
M13 IRD800	Standard-Primer	MWG-Biotech
M13 IRD700	Standard-Primer	MWG-Biotech
T7	Standard-Primer	MWG-Biotech
SP <sub>6</sub> -f	Standard-Primer	MWG-Biotech
SP <sub>6</sub> -r	Standard-Primer	MWG-Biotech
<b>Oligonukleotide zur Analyse der <i>Salk</i>-Linien und für RT-PCR</b>		
Bb1	5'-GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT-3'	Jena Bioscience
LBa1	5'-TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG-3'	Jena Bioscience
Salk_075736-f	5'-TGTTTATGGGAAGACGGAGAG-3'	Jena Bioscience
Salk_075736-r	5'-GGTCGCATTATGTGCCAGC-3'	Jena Bioscience
Salk_024431-f	5'-ATGGCGTCTTCCGCCGCTTCTC-3'	MWG-Biotech
Salk_024431-r	5'-GATGTGCAATGAGTGAATGATG-3'	MWG-Biotech
Salk_025099-f	5'-GCGGTTATGGATTTCAGAGGACC-3'	MWG-Biotech
Salk_025099-r	5'-GAAGAGGAGACTGATCCTTAA-3'	MWG-Biotech
At1g74850-r	5'-TTAAGCTGTGCTCCCTGCTAGTTCTT-3'	MWG-Biotech
At2g34640-r	5'-TTAAGGATCAGTCTCCTCTTC-3'	MWG-Biotech
Actin-f*	5'-GGTAACATTGTGCTCAGTGGTGG-3'	Jena Bioscience
Actin-r*	5'-CTCGGCCTTGAGATCCACATC-3'	Jena Bioscience
<b>Oligonukleotide für DNA-Fragmente für <i>Northern</i>- und <i>run-on</i>-Analysen</b>		
accD-f	5'-TGGATAGTTTTGCTCCTGGTGA-3'	Jena Bioscience
accD-r	5'-TCACGAATCTTTCGCTTTCA-3'	Jena Bioscience
clp-f	5'-CCTGGAGAAGGAGATACATCTTGG-3'	Jena Bioscience
clp-r	5'-CTTGGGCTTCTGTTGCTGAC-3'	Jena Bioscience
atpA-f	5'-TGGTAACCATTAGAGCCGACG-3'	Jena Bioscience
atpA-r	5'-CGACGATTGGTAAGGCAGTCA-3'	Jena Bioscience
atpB-f	5'-GACGTATCGCCAAATCATTG-3'	Jena Bioscience
atpB-r	5'-CGCTGGATAGATACCTTTGGCA-3'	Jena Bioscience
ndhB-f	5'-CTTCAGCTTCAGCCACTCGAA-3'	MWG-Biotech
ndhB-r	5'-CAATCGCAATAATCGGGTTCA-3'	MWG-Biotech
ndhF-f	5'-TCCTTTTTCCGACAGCAACAA-3'	MWG-Biotech
ndhF-r	5'-CTCCATGGCATCAGGTAACCA-3'	MWG-Biotech
rbcl-f	5'-GTATGGACGTCCCCTATTAGGATG-3'	Jena Bioscience
rbcl-r	5'-GGTAGTGAGACCCAATCTTGAGTG-3'	Jena Bioscience

Bezeichnung	Sequenz	Hersteller
rpoA-f	5'-TCGGACACTACAGTGGAAAGTGTGT-3'	Jena Bioscience
rpoA-r	5'-CAATTGTAGATTCTGGGAGGCAA-3'	Jena Bioscience
rpoB-f	5'-GGAAGAGGTTTCATC-3'	Jena Bioscience
rpoB-r	5'-GGAGTAAACGACCTTCT-3'	Jena Bioscience
rps14-f	5'-TCATTTGATTTCGTCGATCCTCA-3'	Jena Bioscience
rps14-r	5'-AACCATTTCCCGAAGGATGTG-3'	Jena Bioscience
rps16-f	5'-AGCCGTTTATCGAATCCTTGC-3'	MWG-Biotech
rps16-r	5'-CATTCCGTAAAAATCCCAGCC-3'	MWG-Biotech

**Tabelle 1:** Oligonukleotidsequenzen zur Amplifikation von Genen (*Arabidopsis thaliana*). Die Amplifikate für die Analyse der *Salk*-Linien sowie für *Northern*-Analysen wurden in den pGem<sup>®</sup>-T Vektor (Promega GmbH, Mannheim) kloniert und sequenziert. \*Referenz: Robinson *et al.*, 1999).

## 1.5 Antikörper

Die in dieser Arbeit verwendeten polyklonalen Kaninchen-Antiseren sind in Tab. 2 aufgelistet. Als sekundäre Antikörper wurden Anti-Kaninchen-IgG gekoppelt mit Meerrettich-Peroxidase von Sigma-Aldrich Chemie (Deisenhofen) verwendet.

Komplexe	Untereinheiten
PSII-UE	PsbA
PSII-UE	PsbO
PSII-UE	Cytb559
PSI-UE	PsaA
PSI-UE	PsaC
PSI-UE	PsaD
PSI-UE	PsaH
Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase	LSU
Cytochrom- <i>b<sub>6</sub>/f</i> -Komplex	PetB
Cytochrom- <i>b<sub>6</sub>/f</i> -Komplex	PetD
ATPase-UE	AtpB
ATPase-UE	AtpE

**Tabelle 2:** Plastidäre und nukleäre Untereinheiten der Thylakoidkomplexe sowie Stromaproteine.

## 1.6 Bakterienstämme, Klone und Plasmide

### *Bakterien:*

<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	Hanahan, 1983
<i>E. coli</i> XL 1-Blue	Bullock <i>et al.</i> , 1987

### *Plasmide:*

Gene	Plasmid	Primer
<b><i>Klone für DNA-Fragmente für Northern-Analysen und run-on Analysen</i></b>		
<i>psaA</i>	pBluescript II KS <sup>+</sup>	M13-f/M13-r
<i>psaB</i>	pBluescript II KS <sup>+</sup>	M13-f/M13-r
<i>psaC</i>	pBluescript II KS <sup>+</sup>	M13-f/M13-r
<i>psaE</i>	pLZ1	T7/SP <sub>6</sub> -f
<i>psaH</i>	pLZ1	T7/SP <sub>6</sub> -f
<i>psbA</i>	pBluescript II KS <sup>+</sup>	M13-f/M13-r
<i>psbO</i>	pLZ1	T7/SP <sub>6</sub> -f

**Tabelle 3:** Klone, entsprechende Vektoren und vektorspezifische *Primer*.

## 1.7 Pflanzenmaterial

Für biochemische Arbeiten wurden *Sinapis alba* var. Albatros und *Arabidopsis thaliana* verwendet. Die genetischen und molekularbiologischen Untersuchungen erfolgten ausschließlich mit *Arabidopsis thaliana* (Ökotyp Columbia). Die T-DNA-Insertions-Linien wurden vom *Nottingham Arabidopsis Stock Center* (NASC) bezogen. Folgende Linien fanden in dieser Arbeit Verwendung:

- *Salk\_075736*
- *Salk\_024431*
- *Salk\_025099*

---

## 1.8 Standardlösungen und Medien

---

LB-Flüssigmedium:	10 g/l Pepton, 5 g/l Hefe-Extrakt, 10 g/l NaCl (pH 7.2)
LB-Agarmedium:	10 g/l Pepton, 5 g/l Hefe-Extrakt, 10 g/l NaCl, 1% Agar (pH 7.2)
10 x TBE-Puffer:	108 g/l Tris, 55 g/l Borsäure, 9.3 g/l EDTA (pH 8.2-8.4)
10 x TE-Puffer:	100 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA (pH 8.0)
10 x Elektroden-Puffer:	0.25 M Tris, 1.92 M Glyzin (pH 8.8)
20 x SSC:	3 M NaCl, 0.33 M Natriumcitrat (pH 7.0)
10 x MOPS	200 mM MOPS, 50 mM Natriumacetat, 20 mM EDTA (pH 7.0)
PBS:	140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1.8 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 7.3)
PBS-T:	140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1.8 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 7.3), 0.1% Tween 20
Laemmli-Puffer:	3 ml 20% SDS, 3 ml β-Merkaptoethanol, 4 ml Glyzerin, Bromphenolblau (Spatelspitze)

---

## 2 Methoden

### 2.1 Handhabung und Kultivierung verwendeter Organismen

#### 2.1.1 Anzucht und Vermehrung von Bakterien

*Escherichia coli*- Bakterien wurden in LB-Flüssigmedium oder auf Agarplatten bei 37°C angezogen. Verwendete Selektionsmarker kamen, wenn nicht anders erwähnt, entsprechend der Angaben von Sambrook *et al.* (1989) zum Einsatz. Die Vermehrung von Plasmiden erfolgte durch Hitzeschocktransformation in gefrierkompetente *E. coli*-Zellen (Hanahan, 1983).

### 2.1.2 Anzucht und Selektion von Pflanzen

Die Anzucht von *Arabidopsis thaliana* in Sterilkulturen erfolgte auf MS-Platten (Murashige und Skoog, 1962), ihre Kultivierung in einem Tag/Nacht-Rhythmus von 16/8 h (50 - 60  $\mu\text{mol } \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , Osram [LW30]) bei einer konstanten Temperatur von 21°C. Zur Samengewinnung wurden die Pflanzen nach 18 Tagen vereinzelt auf Erde in Multiplatten gesetzt und in Aracons (Beta Tech, Gent, Belgien) zur Reife gebracht. Für Selektionsanalysen kamen die Pflanzen auf kanamyzinhaltigem MS-Medium (80  $\mu\text{g/ml}$ ) zur Anzucht. Nach 18 Tagen erfolgte die Auszählung.

Für biochemische Arbeiten wurden die Pflanzen auf Erde unter Langtagbedingungen (Tag/Nacht-Rhythmus von 16/8 h; 80 - 100  $\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ; Osram [LW30]) bei 21°C angezogen.

## 2.2 Biochemische Analysen

### 2.2.1 Isolierung und Lyse von Chloroplasten

Für eine Präparation wurden 2 - 3 kg (FG) Kotyledonen von 5 Tage alten Senfkeimlingen bzw. 4 - 5 Wochen alte *Arabidopsis*-Rosetten eingesetzt. Die Chloroplastenisolation erfolgte nach Schuler und Zielinski (1989). Die isolierten Chloroplasten wurden in 18 Saccharosegradienten fraktioniert (Tiller *et al.*, 1991). Alle Schritte wurden bei 4°C durchgeführt.

Die Lyse der Chloroplasten erfolgte in ca. 200 ml Säulenpuffer A (50 mM Tris/HCl (pH 7.6), 100 mM  $[\text{NH}_4]_2\text{SO}_4$ , 4 mM EDTA, 25% Glycerin, 1% Triton X-100, 40 mM 2-Merkaptoethanol und 50  $\mu\text{g/ml}$  PMSF (Rushlow und Hallick, 1982). Die unlöslichen Chloroplastenfragmente sind durch Zentrifugation (SS34-Rotor, 30 min bei 15000 Upm und 4°C) aus dem Lysat entfernt worden.

### 2.2.2 Gelfiltration an Sepharose 4B/2B

Die präparative Anreicherung einer transkriptionsaktiven Fraktion durch Gelfiltration erfolgte in zwei nacheinander folgenden Schritten und wurde mit selbstgegossenen Säulen durchgeführt (modifiziert nach Rushlow und Hallick, 1982). Tab. 4 gibt eine Übersicht über

die wichtigsten Säulendaten des ersten Gelfiltrationsschrittes. Ein Fraktionssammler (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) diente zum Auffangen der Eluate. Alle Chromatographieschritte wurden bei 4°C durchgeführt.

Säule	Glaswerk Ilmenau
Matrix	Sepharose 4B (Ausschlussgröße 70 x 10 <sup>3</sup> - 20 x 10 <sup>6</sup> kDa)
Durchmesser [cm]	2
Säulenlänge[cm]	100
max. Säulenvolumen [ml]	380
Äquilibriumvolumen [ml]	800
max. Probevolumen [ml]	30
Probeeluat [ml]	30-40
Säulenpuffer A	50 mM Tris/HCl (pH 7.6), 100 mM [NH <sub>4</sub> ] <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 4 mM EDTA, 25% Gyzerin, 1% Triton X-100, 40 mM 2-Merkaptoethanol, 50 µg/ml PMSF

**Tabelle 4:** Säuleneigenschaften der ersten Gelfiltration

Die Auftrennung von 90 ml Chloroplastenlysat erfolgte parallel mit drei Säulen. Das Proteingemisch wurde auf die zuvor mit Säulenpuffer A äquilibrierte Gelmatrix (Flussrate von ca. 6 ml/30 min) geschichtet und schließlich bei einer Flussrate von ca. 6 ml/30 min mit Säulenpuffer A eluiert. Die das TAC enthaltenen Fraktionen, bestimmt anhand der Transkriptionsaktivität (Reiss und Link, 1985), wurden vereinigt. Anschließend wurden die Säulen mit mindestens zwei Volumina Säulenpuffer A gewaschen.

Zur weiteren Anreicherung des TAC-Komplexes folgte nach Krupinska und Falk (1994) ein zweiter Gelfiltrationsschritt. Dazu wurden die vereinigten Eluate für 5 h bei 56000 Upm und 4°C zentrifugiert (Ti70 Rotor). Die Sedimente wurden in 15 ml Säulenpuffer B mit Hilfe eines Potters resuspendiert und die ungelösten Bestandteile abzentrifugiert (SS34 Rotor; 10 min bei 12000 Upm und 4°C). Anschließend kamen die löslichen Proteine auf eine mit Säulenpuffer B äquilibrierten Säule (Charakteristika s. Tab. 5) und bei einem Durchfluss von ca. 6 ml/30 min zur Eluierung. Es folgte eine Zentrifugation der transkriptionsaktiven Fraktionen für 5 h bei 56000 Upm und 4°C (Ti70 Rotor). Die Sedimente wurden durch Potters in 1-2 ml Säulenpuffer C resuspendiert.

---

Säule	Econo Column <sup>®</sup> ; Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Matrix	Sepharose 2B (Ausschlussgröße 70 x 10 <sup>3</sup> - 40 x 10 <sup>6</sup> kDa)
Durchmesser [cm]	1.5
Säulenlänge [cm]	170
max. Säulenvolumen [ml]	301
Äquilibriumvolumen [ml]	600
max. Probevolumen [ml]	4
Probeeluat [ml]	4-6
Säulenpuffer B	50 mM Tris/HCl (pH 7.6), 100 mM [NH <sub>4</sub> ] <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 4 mM EDTA, 25% Gyzerin, 1% Triton X-100, 40 mM 2-Merkaptoethanol, 50 µg/ml PMSF

---

**Tabelle 5:** Säuleneigenschaften der zweiten Gelfiltration

### 2.2.3 Heparin-SepharoseCL-6B-Chromatographie

Die transkriptionsaktive Fraktion wurde in einem weiteren Schritt einer Affinitätschromatographie an Heparin-SepharoseCL-6B bzw. einer Ionenaustauschchromatographie an Q-Sepharose unterzogen. Alle Chromatographieschritte erfolgten bei 4°C und einer Flussgeschwindigkeit von 0.5 ml/min.

Dazu wurde das Proteinpellet nach dem ersten Gelfiltrationsschritt in 1-2 ml Puffer D (50 mM Tris/HCl (pH 7.6), 50 mM [NH<sub>4</sub>]<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 10% Glyzerin, 40 mM 2-Merkaptoethanol und 50 µg/ml PMSF) mit Hilfe eines Potters gelöst. Unlösliche Bestandteile sind durch Zentrifugation (Tischzentrifuge, 10 min bei 12000 Upm und 4°C) entfernt worden. Nach DNase/RNase Behandlung der löslichen Proteinfraction (1h bei 37°C) wurde diese in 18 ml Säulenpuffer C aufgenommen und auf eine mit Säulenpuffer C äquilibrierte Heparinsäule geladen. Die Säule (Säulencharakteristika s. Tab.6) wurde mit 50 ml Puffer C gewaschen und schließlich die gebundenen Proteine mit Eluierungspuffer (50 mM Tris/HCl (pH 7.6), 2M [NH<sub>4</sub>]<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 10% Glyzerin, 4 mM EDTA, 40 mM 2-Merkaptoethanol und 50 µg/ml PMSF) eluiert. Die in einer Stufe eluierten Proteine, verfolgt anhand der Leitfähigkeit des Puffers, wurden in einer Fraktion zu 3 - 5 ml aufgefangen und über Nacht in Säulenpuffer C dialysiert. Die danach schockgefrorenen Proteine lagerten bei -80°C .

---

Säule	C Column; Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Matrix	Heparin-Sepharose CL-6B
Durchmesser [cm]	1
Säulenhöhe [cm]	10
Säulenvolumen [ml]	7
Äquilibriumvolumen [ml]	20
max. Probevolumen [ml]	20
Probeeluat [ml]	5
Säulenpuffer C	50 mM Tris/HCl (pH 7.6), 50 mM $[\text{NH}_4]_2\text{SO}_4$ , 4 mM EDTA, 10% Glycerin, 40 mM 2-Merkaptoethanol, 50 $\mu\text{g/ml}$ PMSF

---

**Tabelle 6:** Säuleneigenschaften der Heparin-Sepharose-Chromatographie

#### 2.2.4 Q-Sepharose-Chromatographie

Die Ionenaustauschchromatographie erfolgte nach den gleichen Angaben wie die Affinitätschromatographie an Heparin-Sepharose. Nur kam als Säulenmaterial Q-Sepharose zum Einsatz. Eine vorhergehende DNase/RNase-Behandlung der Proteinfraction erfolgte nicht. Die Säulencharakteristika sind nachfolgender Tabelle zu entnehmen.

---

Säule	C Column; Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Matrix	Q-Sepharose
Durchmesser [cm]	1
Säulenhöhe [cm]	10
Säulenvolumen [ml]	7
Äquilibriumvolumen [ml]	20
max. Probevolumen [ml]	20
Probeeluat [ml]	5
Säulenpuffer C	50 mM Tris/HCl (pH 7.6), 50 mM $[\text{NH}_4]_2\text{SO}_4$ , 4 mM EDTA, 10% Glycerin, 40 mM 2-Merkaptoethanol, 50 $\mu\text{g/ml}$ PMSF

---

**Tabelle 7:** Säuleneigenschaften der Q-Sepharose-Chromatographie

### 2.2.5 Transkriptionsaktivitätstest

Die *in vitro*-Transkription erfolgte entsprechend den Angaben von Reiss und Link (1985). Der Einbau von [<sup>3</sup>H]UTP in RNA wurde berechnet nach Hallick *et al.* (1976). Die Enzymaktivität des TAC wird in *units* angegeben. Ein *unit* entspricht 1 fmol an eingebautem [<sup>3</sup>H]-UTP während einer 30-minütigen Inkubation bei 30°C (Suck *et al.*, 1996).

## 2.3 Probenvorbereitung und Massenspektrometrie

### 2.3.1 Probenvorbereitung

Die Nukleinsäuren aus der angereicherten transkriptionsaktiven Fraktion wurden durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion beseitigt. Diese erfolgte zwei Mal mit einem Volumen Phenol (puffergesättigt)/Chloroform. Nach Zentrifugation (5 min bei 12000 Upm) wurde der Überstand abgenommen. Aus der organischen Phase wurden die Proteine mit 4 Volumen Ethanol bei -20°C über Nacht präzipitiert (30 min bei 10000 Upm und 4°C). Das Sediment wurde zweimal mit absolutem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 µl Ammoniumhydrogenkarbonatpuffer (50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> und 0.05% β-Dodecylmaltosid) gelöst. Es folgte eine Denaturierung der Proteine bei 95°C für 10 min. Die tryptische Verdauung der Proteinproben erfolgte nach Angaben des Herstellers (Promega GmbH, Mannheim) bei 37°C für 16 h. Nach dem Verdau wurde das erhaltene Peptidgemisch über eine mit POROS-R2 (Applied Biosystems, Foster City, USA) überschichteten C18 Zip-Tip Säule (Millipore, Eschborn) aufgearbeitet (Stauber *et al.*, 2003).

Die Analyse silbergefärbter Proteinbanden erfolgte nach Mortz *et al.* (1994).

### 2.3.2 ESI-IONTRAP (*Electrospray Ionization – Ion Trap*)- Massenspektrometrie

Die Aufnahmen von MS- und MS/MS-Massenspektren wurden mit einem LCQ Deca XP IONTRAP-Massenspektrometer (Thermo; San Jose, USA) mit vorgeschalteter Nano-HPLC-Anlage (Ultimate, Dionex, Idstein) nach Stauber *et al.* (2003) durchgeführt. Die

Flüssigkeitschromatographie erfolgte an einer *reverse phase* Säule (PepMap C18 column; LC-Packings, Dionex, Idstein).

### 2.3.3 Analyse der massenspektrometrischen Daten

Die Identifizierung von Proteinen erfolgte über den Vergleich der ermittelten Peptidmassen mit theoretischen Massen tryptisch gespaltener Proteine aus der *Arabidopsis thaliana*-Datenbank ([ftp://ftp.arabidopsis.org/Sequences/blast\\_datasets/](ftp://ftp.arabidopsis.org/Sequences/blast_datasets/)), die bei TAIR (*The Arabidopsis Information Resource*) zur Verfügung steht. Dabei kam die Software Finnigan Sequest/Turbo Sequest (*revision 2.0*; ThermoQuest, San Jose, USA) zum Einsatz.

### 2.3.4 Proteinanalyse

Die Analysen der mittels Massenspektrometrie identifizierten Proteine erfolgten mit folgenden Softwareprogrammen:

ChloroP	<a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/">http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/</a>
ExPASy	<a href="http://us.expasy.org/tools/">http://us.expasy.org/tools/</a>
Interpro Scan	<a href="http://www.ebi.ac.uk/InterProScan/">http://www.ebi.ac.uk/InterProScan/</a>
Kazusa DNA Research	<a href="http://www.kazusa.or.jp/en/">http://www.kazusa.or.jp/en/</a>
National Center for Biotechnology Information	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a>
Pfam	<a href="http://pfam.cgb.ki.se/Pfam/hmmsearch.shtml">http://pfam.cgb.ki.se/Pfam/hmmsearch.shtml</a>
PROSITE	<a href="http://www.ebi.ac.uk/ppsearch/">http://www.ebi.ac.uk/ppsearch/</a>
Predotar	<a href="http://www.inra.fr/predotar/">http://www.inra.fr/predotar/</a>
Prosite	<a href="http://www.expasy.org/prosite/">http://www.expasy.org/prosite/</a>
PSORT	<a href="http://www.psort.org/">http://www.psort.org/</a>
TAIR	<a href="http://www.arabidopsis.org/">http://www.arabidopsis.org/</a>
TIGR	<a href="http://www.tigr.org/tdb/e2k1/ath1/LocusNameSearch.shtml">http://www.tigr.org/tdb/e2k1/ath1/LocusNameSearch.shtml</a>

## 2.4 Molekularbiologische Grundtechniken

Die im folgenden nicht gesondert aufgeführten Methoden erfolgten nach Sambrook *et al.* (1989) bzw. Vorgaben der jeweiligen Produkthersteller.

## 2.5 DNA-Analysen

### 2.5.1 DNA-Isolation

Die Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde nach der Methode von Birnboim und Doly (1979) durchgeführt. Die Extraktion genomischer DNA aus *Arabidopsis thaliana* erfolgte nach Dellaporta *et al.* (1983). Zur Analyse einzelner Pflanzen wurden 1-2 Blätter mit 900 µl Lyse-Puffer (7.0 M Harnstoff, 0.3 M NaCl, 50 mM Tris/HCl (pH 8.0), 20 mM EDTA, 0.08% (v/v) N-Laurylsarkosin) im Mörser homogenisiert. Der Inkubation von 5 min bei 37°C schloss sich eine Phenol/Chloroform-Extraktion an. Die isolierte DNA wurde in 20 µl 0.1 x TE aufgenommen.

### 2.5.2 Amplifizierung von DNA-Sequenzen mit der Polymerase-Kettenreaktion

In dieser Arbeit kam die Polymerase-Kettenreaktion (PCR [Saiki *et al.*, 1988]) zu genomischen Analysen der T-DNA-Mutanten zum Einsatz. Zur Amplifizierung der vollständigen genomischen Sequenz dienten zwei genspezifische Primer. Die genomischen Teilsequenzen, vor und nach der inserierten T-DNA, wurden durch einen genspezifischen Primer in Kombination mit einem T-DNA-spezifischen Primer gewonnen. Die Amplifikate dieser Fragmente wurden zur Sequenzierung in den pGem<sup>®</sup>-T Vektor kloniert. Auch der Klonierung von cDNA-Fragmenten für Northern-Analysen in pGem<sup>®</sup>-T Vektor ging eine Amplifizierung voraus (Tab. 1).

### 2.5.3 Sequenzierung der DNA nach Sanger *et al.* (1977)

In dieser Arbeit erfolgte die Analyse mit dem automatischen Li-COR 2400-Sequenzierer (MWG-Biotech AG, Ebersberg). Bei der Reaktion kam ein Reagenziensatz der Firma Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) zum Einsatz. Die Auswertung erfolgte mit ImageIR<sup>TM</sup>-Software (MWG-Biotech AG, Ebersberg).

## 2.6 RNA-Analysen

### 2.6.1 RNA-Isolation

Für RT-PCR und *Macroarray*-Analysen wurde Gesamt-RNA mit Trizol-Reagenz der Firma Gibco BRL (Karlsruhe) nach deren Angaben isoliert. Die RNA-Isolation für *Northern*-Analysen erfolgte nach Ausubel *et al.* (1989).

### 2.6.2 *Northern*-Analysen

Hierfür wurden 15 µg Gesamt-RNA drei Wochen alter Pflanzen in denaturierenden 1.2% igen Agarosegelen (1 x MOPS, 2% Formaldehyd) aufgetrennt und mittels Saugströmung in 20 x SSC auf eine Nylonmembran (Roti<sup>®</sup>Plus) transferiert (Sambrook *et al.*, 1989). Die Fixierung der RNA an die Membran erfolgte durch UV-Belichtung (254 nm, 3 min). Der Nachweis spezifischer mRNAs wurde mit  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP-markierten DNA-Sonden (Feinberg und Vogelstein, 1984) durchgeführt (Tab. 1). Anschließende Hybridisierungsschritte erfolgten wie bereits beschrieben (2.3.3).

### 2.6.3 Reverse Transkription von RNA

Mit Hilfe von *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) wurde die gewebespezifische mRNA-Menge der interessierenden Gene sowie das Vorhandensein der

entsprechenden Transkripte in den *Salk*-Linien untersucht. Dabei wurde die mRNA durch reverse Transkriptase (RevertAid™ H Minus M-MuLV *Reverse Transcriptase*; MBI-Fermentas GmbH, St. Leon-Roth) in cDNA umgeschrieben und durch anschließende PCR als doppelsträngige DNA amplifiziert. Das dieser Arbeit zugrunde liegende Protokoll bezieht sich auf Angaben des Herstellers der hierfür verwendeten Enzyme.

#### 2.6.4 *In organello* - *run-on* - Transkription

Für *organello-run-on*-Transkriptionsanalysen wurden Chloroplasten aus 12 g (FG) von 24 Tage alten *Arabidopsis*-Pflanzen nach bereits beschriebener Methode isoliert (2.2.1). Die *run-on*-Transkription erfolgte nach Mullet und Klein (1987) mit  $2 \times 10^7$  Chloroplasten in einem Reaktionsmix von 100  $\mu$ l Gesamtvolumen (50 mM Hepes/KOH pH 8.0, 33 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 125  $\mu$ M ATP, 125  $\mu$ M CTP, 125  $\mu$ M GTP, 10  $\mu$ M UTP, 50  $\mu$ Ci  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-UTP (110 TBq/mmol) und 55  $\mu$ g Heparin). Der Einbau an  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-UTP in RNA wurde nach Hallick *et al.* (1976) gemessen. Zur Untersuchung plastidärer Transkriptionsraten wurden jeweils 4 pmol Plasmid-DNA (Tab. 1) in 0.5 M NaOH auf eine Nylonmembran (Roti®Plus) mit Hilfe einer Transferapparatur (Hoefer: 4 x 12 *slots*) übertragen. Als Kontroll-DNA diente der Vektor pGem®-T verwendet. Die Fixierung der DNA erfolgte durch UV-Belichtung (254 nm, 3 min). Die Prähybridisierung wurde für 4 h bei 50°C in 50% Formamid, 7% SDS, 0.12 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 7.2) und 0.25 M NaCl) durchgeführt. Die Hybridisierung der Membranen mit  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-UTP-markierten *run-on*-Transkripten erfolgte für 16 h bei 50°C. Anschließend wurden die Membranen kurz in 2 x SSC plus 1% SDS und 1 x SSC plus 0.5% SDS gewaschen. Die Auswertung wurde am PhosphorImager (Storm™, Molecular Dynamics, Freiburg) vorgenommen.

#### 2.6.5 cDNA-Arrays

Die Untersuchungen der Transkriptakkumulation plastidärer Gene erfolgte in drei Experimenten mit unterschiedlichen *Macroarrays* und cDNA-Proben aus unabhängigen RNA-Isolationen. Die *Array*-Hybridisierungen sowie die Datenanalyse wurden freundlicherweise von Dr. A. Kandlbinder (Universität Bielefeld, Lehrstuhl für Biochemie

und Physiologie der Pflanzen) vorgenommen (Kandlbinder *et al.*, 2004). Die Auswertung erfolgte nach folgenden Kriterien:

- (i) Die Signalintensität beträgt mindestens 120% des Hintergrundes.
- (ii) Die Signalintensitäten aus der Doppelspottung unterscheiden sich um weniger als 30%.

Entsprechend diesen Kriterien wurde die Signifikanz der Daten mit Hilfe des Student's T-Test ermittelt:

- $p < 0.05$ : hoch signifikant (\*\*\*)
- $0.05 < p < 0.10$ : signifikant (\*\*)
- $0.10 < p < 0.20$ : Trend zur Signifikanz (\*)

## 2.7 Proteinanalysen

### 2.7.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentrationen, falls nicht anders erwähnt, wurden nach der Methode von Bradford (1976), mit Rinderserumalbumin zur Erstellung der Eichkurve, bestimmt.

### 2.7.2 Proteinextraktion

Unter flüssigem Stickstoff gemörsertes Pflanzenmaterial wurde mit fünf Volumen Homogenisationsmedium versetzt und für 10 - 15 min auf Eis inkubiert. Durch anschließende Zentrifugation (10 min bei 15000 Upm) erfolgte die Fraktionierung der Proteine in lösliche und Membranproteine. Die löslichen Proteine wurden mit Trichloressigsäure bis zu einer Endkonzentration von 15% auf Eis präzipitiert, das Präzipitat zweimal mit 80% igem Aceton gewaschen, in der "SpeedVac"-Vakuumentrifuge (Genevac SF50; Biometra, Göttingen) getrocknet und in Probenpuffer (100mM NaCO<sub>3</sub>, 50 mM Dithioerythrit und 10% Saccharose) resuspendiert. Die Membranproteine kamen direkt in Probenpuffer.

### 2.7.3 Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen wurden 15 µg Protein mit Laemmli-Puffer (Laemmli, 1970) versetzt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte nach Laemmli (1970) in denaturierenden, 12.5% igen SDS-Polyacrylamidgelen (SDS-PAGE). Zum Anfärben der Proteine wurde Silbernitrat (Blum *et al.*, 1987) verwendet.

### 2.7.4 Proteintransfer

Der Proteintransfer für *Western-blot*-Analysen erfolgte auf PVDF-Membran (Amersham Bioscience Europe GmbH, Freiburg) mittels Elektrotransfer (Owl Separation System; Peqlab Biotechnology GmbH, Erlangen).

### 2.7.5 Immunreaktion und Proteinnachweis

Die immunologischen Analysen wurden nach Peskan *et al.* (2000) durchgeführt. Der Nachweis der Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörper erfolgte nach der ECL-Methode (Adamska *et al.*, 1993).

## 2.8 Elektronenmikroskopische Aufnahmen

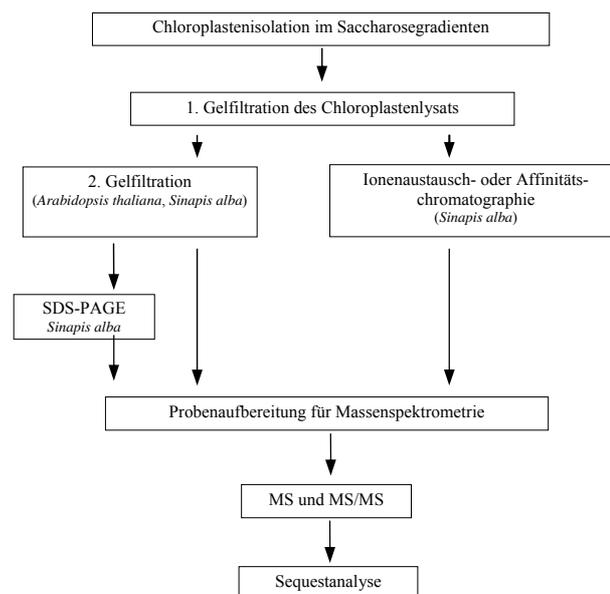
Die elektronenmikroskopischen Bilder wurden freundlicherweise von Dr. W. Fischer (Institut für Allgemeine Botanik, Friedrich-Schiller-Universität Jena) aufgenommen.

### III. Ergebnisse

#### 1 Proteomanalyse des TAC-Komplexes

##### 1.1 Anreicherung einer transkriptionsaktiven Fraktion

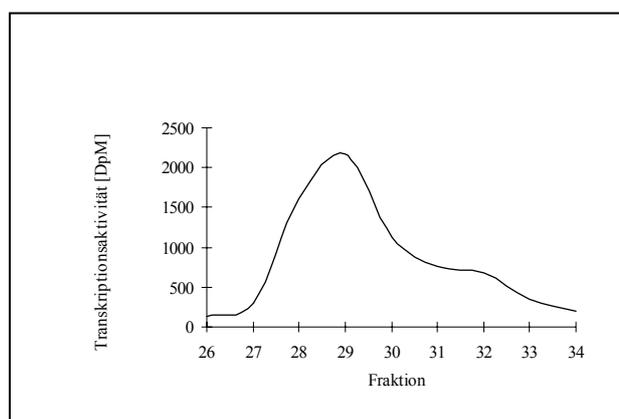
Die Anreicherung des TAC-Komplexes erfolgte in mehreren chromatographischen Schritten. Zunächst wurden die im kontinuierlichen Saccharosegradienten fraktionierten Chloroplasten lysiert und die erhaltenen Proteine über die erste Gelfiltrationssäule aufgetrennt. Nach Elution und Konzentration durch Ultrazentrifugation der transkriptionsaktiven Fraktionen wurde das TAC entweder durch einen zweiten Gelfiltrationsschritt angereichert oder es schloss sich eine Affinitäts- bzw. Ionenaustauschchromatographie an. Auf diese Weise sollten einerseits der TAC-Komplex angereichert und andererseits DNA/RNA-Bindeproteine aus dem TAC isoliert werden. Die Isolation des TAC-Komplexes aus *Arabidopsis thaliana* erfolgte durch zwei Gelfiltrationsschritte. Das TAC aus *Sinapis alba* wurde in unabhängigen Isolationen mit allen drei genannten biochemischen Methoden angereichert. Die Analyse der Proteinzusammensetzung des TAC erfolgte im Anschluss der chromatographischen Anreicherung bzw. nach gelelektrophoretischer Trennung der Proteine mittels SDS-PAGE. Eine Übersicht über die erfolgten Arbeitsschritte ist in Abb. 1 gegeben.



**Abbildung 1:** Schema zur Anreicherung der TAC-Fraktion. Die Anreicherung des TAC-Komplexes aus isolierten Chloroplasten erfolgte durch zwei Gelfiltrationsschritte (*Arabidopsis thaliana* und *Sinapis alba*) oder

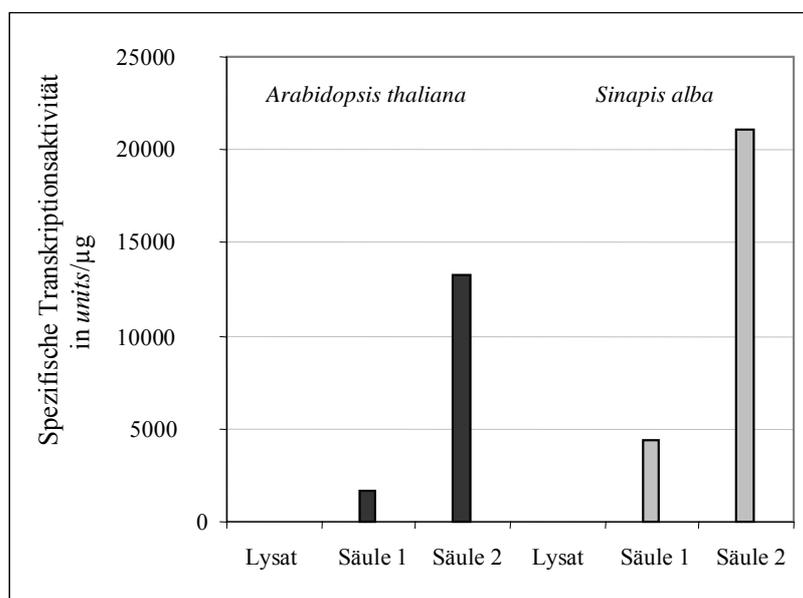
durch einen Gelfiltrationsschritt mit nachfolgender Affinitäts- bzw. Ionenaustauschchromatographie (*Sinapis alba*). Die TAC-Proteine aus Senf, angereichert durch zwei Gelfiltrationssäulen, wurden außerdem mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Nach tryptischer Verdauung der Proteine bzw. der Proteinbanden wurde die TAC-Zusammensetzung im ESI-IONTRAP analysiert und schließlich mit Turbo Sequest (*revision 2.0*; Thermo, San Jose, USA) identifiziert.

Mit Hilfe der Gelfiltration konnten die Chloroplastenproteine zunächst nach ihrer Molekülgröße getrennt werden. Dabei eluierte das TAC, detektiert anhand der Transkriptionsaktivität, im Ausschlussvolumen der Säulen. Das Elutionsprofil der 2. Säule für die Isolation des TAC aus *Sinapis alba* ist in Abb. 2 gezeigt.



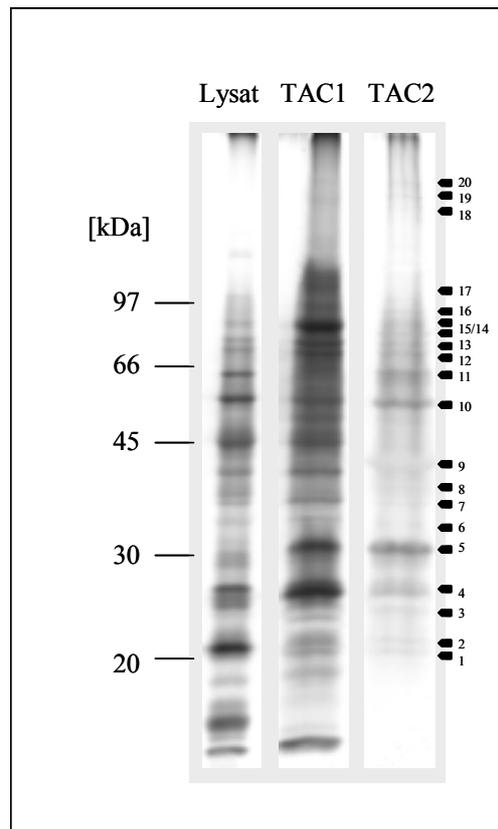
**Abbildung 2:** Elutionsprofil des TAC-Komplexes aus *Sinapis alba* während der 2. Gelfiltration. Die Elution der TAC-Fractionen wurde anhand der Transkriptionsaktivität verfolgt.

Die Enzymaktivität wurde durch einen *in vitro* Transkriptionstest des gesamten Chloroplastenlysats und der durch Ultrazentrifugation konzentrierten transkriptionsaktiven Fraktionen nach erfolgter Gelfiltration gemessen und gemäß Hallick *et al.* (1976) berechnet. Die Berechnungen der spezifischen Transkriptionsaktivität der einzelnen Fraktionen zeigen, dass eine 4- bis 8- fache Anreicherung der spezifischen Enzymaktivität mit dem zweiten Gelfiltrationsschritt im Verhältnis zum ersten erreicht werden konnte (Abb. 3). Nach der Affinitäts- und Ionenaustauschchromatographie konnte keine Transkriptionsaktivität in den erhaltenen Fraktionen gemessen werden.



**Abbildung 3:** Analyse plastidärer transkriptionsaktiver Fraktionen. Spezifische Transkriptionsaktivitäten in *units/µg* isoliert aus *Arabidopsis thaliana* (schwarz) und *Sinapis alba* (grau): Chloroplastenlysat, TAC-Fraktion nach erster und zweiter Säulenreinigung.

Ein Vergleich des Proteinmusters einer TAC-Fraktion aus *Sinapis alba* lässt ebenfalls auf eine Anreicherung des TAC-Komplexes durch einen weiteren Gelfiltrationsschritt schließen. Hierfür wurden TAC-Fractionen nach erster (TAC1:  $7.5 \times 10^4$  *units*) sowie zweiter Gelfiltration (TAC2:  $1 \times 10^5$  *units*) in einem 12.5%igen SDS-Gel aufgetrennt. Einige abundante Proteine des TAC1 sind im TAC2 nicht vertreten, so in den Bereichen von 90 - 100 kDa, 30 - 50 kDa und 10 - 20 kDa. Dagegen treten andere Banden erst im TAC2 stärker hervor: 3, 9, 10, 11, 19 und 20 (Abb. 4). Die in Abb. 4 mit Pfeilen gekennzeichneten Proteinbanden des TAC2 wurden massenspektrometrisch untersucht. Dabei identifizierte Proteine sind in Tab. 10 mit entsprechenden Informationen zu NCBI-Zugangsnummer (NCBI, *National Center for Biotechnology Information*), Molekulargewicht, Peptidposition innerhalb des korrespondierenden Proteins, Ladungszustand des Peptides, Differenz der gemessenen Masse zur theoretischen Masse zusammengefasst (s. unter 3.2.1).



**Abbildung 4:** Vergleich des Proteinmusters (*Sinapis alba*) nach SDS-PAGE und Silberfärbung. In folgender Reihenfolge wurde aufgetragen: Chloroplastenlysat (Spur 1); TAC1 (Spur 2, TAC-Fraktion nach erster Gelfiltrationssäule an Sepharose 4); TAC2 (Spur 3, TAC-Fraktion nach zweiter Gelfiltrationssäule an Sepharose 2). Dabei kam von den TAC-Fraktionen 1 und 2 jeweils die gleiche Menge Transkriptionsaktivität (*units*) zum Einsatz. Die Größe eines Proteinmarkers ist links abgebildet. Die Pfeile symbolisieren Proteinbanden, die massenspektrometrisch analysiert wurden.

## 1.2 Massenspektrometrische Analyse der TAC-Komponenten

### 1.2.1 Identifizierung der TAC-Proteine nach Gelfiltrationschromatographie

Zur Untersuchung der Proteinzusammensetzung der isolierten TAC-Fraktionen wurden erstmals massenspektrometrische Analysen vorgenommen. Dazu wurden TAC-Komplexe aus *Arabidopsis thaliana* und *Sinapis alba* mit bereits beschriebenen Techniken angereichert. Nach Entfernen der Nukleinsäuren durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion wurde das

Proteingemisch einer tryptischen Spaltung unterzogen und schließlich MS- und MS/MS-Spektren mittels ESI-IONTRAP aufgenommen. Ferner wurde das nach zwei Gelfiltrationssäulen angereicherte TAC aus Senfchloroplasten in einem eindimensionalen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und nach erfolgter Silberfärbung die Banden ausgeschnitten, mit Trypsin verdaut und ebenfalls im ESI-IONTRAP untersucht (3.2.3). Die Identifizierung der Peptide erfolgte durch einen Massenvergleich der ermittelten Massen mit theoretischen Peptidmassen aus der *Arabidopsis*-Datenbank ([ftp://ftp.arabidopsis.org/Sequences/blast\\_datasets/](ftp://ftp.arabidopsis.org/Sequences/blast_datasets/)) mit Hilfe der Software Turbo Sequest (*revision 2.0*; Thermo, San Jose, USA). Bei TAC-Isolationen aus *Sinapis alba* erfolgte die Analyse der Massenspektren ebenfalls gegen die *Arabidopsis*-Datenbank.

In Tab. 8 sind die in TAC-Fractionen aus *Arabidopsis thaliana* und *Sinapis alba* identifizierten Proteine aufgelistet. Für die Zusammenstellung galten folgende Kriterien:

- (i) Der mittels Sequest ermittelte Korrelationsfaktor  $X_{\text{corr}}$  besitzt Werte von  $\geq 1.5$ , 2.5 oder 3.5 für einfach, zweifach oder dreifach geladene Peptidionen.
- (ii) Mindestens zwei verschiedene Peptide innerhalb des korrespondierenden Proteins wurden in einer unabhängigen TAC-Isolation gefunden.
- (iii) Die Proteine konnten in mindestens zwei unabhängigen TAC-Präparationen detektiert werden.

Entsprechend den Kriterien konnten folgende Proteine identifiziert werden: (i) 14 klassifizierte Proteine, die an unterschiedlichen plastidenlokalisierten biochemischen Prozessen beteiligt sind, wie Transkription, Replikation, Translation, Detoxifikation, Proteinmodifikation sowie Metabolismus und (ii) zwölf Proteine mit unbekannter biologischer Funktion, denen möglicherweise ebenfalls eine Beteiligung am plastidären Replikations-, Transkriptions- oder Translationssystem zukommt. Neben den vier Untereinheiten  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\beta'$  und  $\beta''$  des *core*-Enzyms der plastidären RNA-Polymerase konnten auch Komponenten nachgewiesen werden, die bereits in einer hochgereinigten Fraktion der löslichen RNA-Polymerase aus *Sinapis alba* beschrieben worden sind. Dazu gehören die Eisen-Superoxid-Dismutasen (FE-SOD) und die Fruktokinase-ähnlichen Proteine (PFKB). Bei FE-SOD3 (FSD3, At5g23310) und der PFKB2 (At3g54090) handelt es sich exakt um die gleichen Proteine, die in der löslichen RNA-Polymerase-Fraktion aus Senfchloroplasten

massenspektrometrisch detektiert wurden (Ogrzewalla, Dissertation 2001; Ogrzewalla *et al.*, 2002; Link, 2003). Unter den identifizierten Proteinen befinden sich außerdem eine putative DNA-Polymerase A (At3g20540) und zwei putative Untereinheiten der DNA-Gyrase (At3g10690 und At3g10270), die an Replikationsprozessen beteiligt sind. Vom Translationssystem konnte der Elongationsfaktor EF-Tu (*elongation factor Tu*, At4g20360) und das ribosomale Protein L12-A (*50S ribosomal protein L12-A*, At3g27830) eindeutig identifiziert werden. Des Weiteren kam in mehreren unabhängigen TAC-Isolationen ein putatives Thioredoxin (At3g06730) vor. Von zwölf Proteinen unbekannter Funktion wurden neun mit einer Sequenzabdeckung von 19 - 42% identifiziert: (1) PTAC1 (*DNA-binding protein-related*, At1g14410), (2) PTAC3 (*SAP domain-containing protein*, At3g04260), (3) PTAC4 (*Pspa/IM30 family protein*, At1g65260), (4) PTAC6 (*expressed protein*, At1g21600), (5) PTAC7 (*expressed protein*, At5g24314), (6) PTAC8 (*expressed protein*, At2g46820), (7) PTAC10 (*hypothetical protein*, At3g48500), (8) PTAC11 (*hypothetical protein*, At2g02740) und (9) PTAC12 (*unknown protein*, At4g20010). Bei drei weiteren Proteinen lag eine Sequenzabdeckung von weniger als 15% vor: PTAC2 (*pentatricopeptide repeat-containing protein*, At1g74850), PTAC5 (*peptidoglycan-binding domain-containing protein*, At4g13670) und PTAC9 (*expressed protein*, At4g20010; [Tab. 11]).

Achtzehn der identifizierten Proteine konnten sowohl in TAC-Fractionen aus *Arabidopsis thaliana* als auch aus *Sinapis alba* identifiziert werden. Eine Ausnahme bilden die putative DNA-Polymerase A (At3g20540), FE-SOD1 (At5g51100), PFKB1 (At1g69200), PTAC8 (At2g46820), PTAC9 (At4g20010) und PTAC12 (At2g34640). Diese wurden nach Gelfiltrations- bzw. Affinitätschromatographie ausschließlich im TAC von *Arabidopsis thaliana* detektiert. Dagegen waren das ribosomale Protein L12-A (At3g27830) und Pspa/IM30-Protein (At1g65260) nur in Senf-TAC-Fractionen nachweisbar. Da bei massenspektrometrischen Analysen von Senfproteinen nur eine *Arabidopsis*-Datenbank zur Verfügung stand, ist es wahrscheinlich, dass einige TAC-Proteine aus *Sinapis alba* auf Grund der Sequenzabweichung zu *Arabidopsis* nicht identifiziert werden konnten. Andererseits sind auch art- und entwicklungspezifische Unterschiede in der TAC-Zusammensetzung möglich. Letztere könnten erklären, warum einige der identifizierten Proteine in Senf aber nicht in *Arabidopsis* vorzufinden sind.

NCBI Nr. <sup>a</sup>	AGI Acc Nr. <sup>b</sup>	Proteinname und AtDB-Annotierung	Isolationsmethode <sup>c</sup> <i>Arabidopsis</i> <i>Sinapis</i>	Position <sup>d</sup>	Z <sup>e</sup>	$\Delta M^f$ <i>Arabidopsis</i> <i>Sinapis</i>	X <sub>corr</sub> <sup>g</sup> <i>Arabidopsis</i> <i>Sinapis</i>
<b>Transkription</b>							
gi 7525065	Plastiden	RpoA = <i>RNA polymerase alpha chain</i>	GF HS/SQ	40-50 292-310 322-328	2 2 2	0.6 -0.1	6.62 2.60
gi 2196464	Plastiden	RpoB = <i>RNA polymerase beta chain</i>	GF GF GF GF GF GF/HS	13-31 32-43 276-290 322-337 354-386	2 2 2 2 3	-0.2 0.0 0.4 0.1 0.7	4.30 3.95 4.36 4.98 3.60
gi 7525024	Plastiden	RpoC1 = <i>RNA polymerase beta ' chain</i>	GF/SQ GF GF GF GF GF GF	12-26 173-188 287-297 303-314 327-341 382-394 434-454	2 2 2 2 2 2 3	1.0 0.4 0.6 0.3 -0.6	3.34 3.60 3.54 2.69 3.30
gi 7525023	Plastiden	RpoC2 = <i>RNA polymerase beta '' chain</i>	GF GF GF	44-68 69-84 241-249	2 2 2	0.5 0.3 -0.8	3.30 6.04 2.98
			GF/HS GF GF GF GF GF GF	940-957 993-1017 1025-1048 1056-1069	2 3 2 2	0.3 0.0 1.4 0.3	3.57 4.73 2.72 5.12
			GF GF GF GF GF GF GF	387-397 450-466 603-621 918-932	2 2 2 2	0.7 -0.6 -0.4 -1.1	3.47 4.11 3.16 4.64
			GF GF GF GF GF GF GF	461-474 485-510	2 3	0.3 1.0	3.97 3.78
			GF GF GF GF GF GF GF	521 327	2 2	0.2 0.9	5.21 3.27

NCBI Nr. <sup>a</sup>	AGI Acc Nr. <sup>b</sup>	Proteinname und AtDB-Annotierung	Isolationsmethode <sup>c</sup>		Position <sup>d</sup>	Z <sup>e</sup>	ΔM <sup>f</sup>		X <sub>corr</sub> <sup>g</sup>	
			<i>Arabidopsis</i>	<i>Sinapis</i>			<i>Arabidopsis</i>	<i>Sinapis</i>	<i>Arabidopsis</i>	<i>Sinapis</i>
			GF	HS	250-260	2	0.3	0.3	3.72	3.26
			GF		266-276					
			GF		277-288	2	0.3	0.3	2.91	
			GF		307-338	3	-1.0	-1.0	3.02	
			GF		434-454	3		0.2		5.12
			GF		485-510	3	1.0	1.0	3.78	
			GF		526-535	2	0.4	0.4	2.07	
			GF		590-608	2	0.7	0.7	2.78	
			GF		610-620	2	1.0	1.0	2.54	
			GF	SQ	720-730	2	1.3	0.1	2.99	2.59
			GF		779-801	2	1.1	1.1	3.12	
			GF		810-823	2	-0.6	-0.6	2.96	
			GF	HS	824-834	2	0.7	-0.3	2.98	3.98
			GF		1152-1162	2	0.0	0.0	2.61	
			GF		1227-1248	3	0.1	0.1	5.12	
			GF		1309-1325	2	0.3	0.3	3.92	
			GF		1345-1354	2	0.3	0.3	2.92	
<b>DNA-Replikation, DNA-Topologie, DNA-Bindung</b>										
gi 11994141	At3g20540	PolA (DNA polymerase A, putative)	GF		287-302	2	0.3	0.3	3.92	
			GF		342-356	2	0.6	0.6	4.12	
			GF		448-466	2	-1.1	-1.1	2.72	
gi 15228353	At3g10690	GyrA (DNA gyrase subunit A, putative)	GF		109-125	2	-0.3	-1.6	2.89	2.90
			GF		194-201	1	0.7	0.7	2.19	
			GF		220-248	3	0.0	0.0	4.52	
			GF		352-365	2	-0.9	-0.9	3.91	
			GF		405-417	2	0.6	0.6	3.79	
			GF		444-453	2	-0.8	-0.8	2.85	
			GF	HS	535-548	2	0.6	0.6	4.22	
			GF	GF/HS	562-571	2	-1.6	-1.6	2.90	
			GF		675-692	2	-1.7	-1.7	3.91	

NCBI Nr. <sup>a</sup>	AGI Acc Nr. <sup>b</sup>	Proteinname und AtDB-Annotierung	Isolationsmethode <sup>c</sup>		Position <sup>d</sup>	Z <sup>e</sup>	ΔM <sup>f</sup>		X <sub>corr</sub> <sup>g</sup>	
			Arabidopsis	Sinapis			Arabidopsis	Sinapis	Arabidopsis	Sinapis
gi 15228245	At3g10270	GyrB (DNA gyrase subunit B, putative)	GF	HS	368-394 484-499	3	-0.4 -1.6	3.61 5.81		
<b>Translation</b>										
gi 15237059	At4g20360	EF-Tu = elongation factor Tu	GF	GF/HS	283-301 316-326	2	-0.1 0.4	4.42 3.44	3.19	
gi 15232274	At3g27830	L12-A = 50S ribosomal protein	GF	GF	69-82 83-91	2	0.3 0.6	4.57 2.87		
<b>Detoxifikation, Proteinmodifikation</b>										
gi 15241373	At5g51100	FE-SOD1 (superoxide dismutase [Fe], putative)	GF		92-113 155-165	2	0.6 0.0	5.80 3.77		
gi 11358867	At5g23310	FE-SOD3 = iron superoxide dismutase (FSD3)	GF	GF	168-184 188-199	2	1.1 -0.8	4.03 4.28	3.67	
			GF	GF	210-241	3	-0.4	4.72		
			GF		243-252	2	0.0	3.15		
			GF	GF	253-262	2	0.3	2.97	3.17	
gi 15230779	At3g06730	ThR (thioredoxin, putative)	GF	GF	96-106 145-161	2	0.7 -1.5	3.33 3.83		
			GF		228-245	3	-1.5	3.68		
			GF	GF	80-90	2	0.5	3.58	3.41	
			GF	GF	132-142	2	0.3	3.14	3.40	
			GF		166-183	2	0.8	2.91		
<b>Metabolismus, Kinaseaktivität</b>										
gi 15222232	At1g69200	PFKB1 = pfkB-type carbohydrate kinase family protein	GF		89-119 227-235	3	-1.5 0.7	4.75 2.66		
			GF		334-342	2	0.1	2.87		
			GF		396-412	2	0.6	4.20		
			GF		437-454	2	0.8	3.96		
			GF		490-504	2	1.1	2.80		

NCBI Nr. <sup>a</sup>	AGI Acc Nr. <sup>b</sup>	Proteinname und AtDB-Annotierung	Isolationsmethode <sup>c</sup>		Position <sup>d</sup>	Z <sup>e</sup>	ΔM <sup>f</sup>		X <sub>corr</sub> <sup>g</sup>	
			Arabidopsis	Sinapis			Arabidopsis	Sinapis	Arabidopsis	Sinapis
gi 15232415	At3g54090	PFKB2 = <i>pfkB-type carbohydrate kinase family protein</i>	GF		505-516	2	0.6		3.22	
			GF		601-614	2	0.5		3.83	
gi 15232415	At3g54090	PFKB2 = <i>pfkB-type carbohydrate kinase family protein</i>	GF	GF	146-160	3	-0.8	-0.5	3.46	3.05
			GF		223-240	2	0.6		4.32	
			GF		327-341	2	0.0		3.04	
			GF		364-373	2				
			GF	GF	401-413	2				
<b>Biologischer Prozess unbekannt, DNA/RNA-Bindung</b>										
gi 15223748	At1g14410	PTAC1 ( <i>DNA-binding protein-related</i> )	GF		64-80	2	0.5		3.20	
			GF		81-89	2		0.7		2.91
			GF		181-199	2	0.2	0.7	3.10	3.22
			GF		200-213	2	0.6		3.64	
			GF		214-247	3	0.1		3.73	
			GF		248-263	2	0.0		3.56	
gi 15221411	At1g74850	PTAC2 ( <i>pentatricopeptide repeat-containing protein</i> )	GF	HS	57-69	2		0.4		3.15
			GF	HS	103-113	2	-0.2	0.8	3.77	3.76
			GF	HS	192-201	2	0.3	-0.5	3.37	3.18
			GF		224-239	2	0.6		4.20	
			GF		718-740	2	0.4		2.98	
			GF		741-753	2	0.4		3.48	
gi 15229259	At3g04260	PTAC3 ( <i>SAP domain-containing protein</i> )	GF		88-109	2	-0.3		4.90	
			GF		178-189	2	0.1		4.59	
			GF		304-319	2	-0.3		3.86	
			GF		353-376	2	1.4		4.77	
			GF	GF	384-395	2	0.4	0.0	4.25	3.01
			GF		414-438	2	0.6		5.10	
			GF		459-479	2	0.8		5.30	
			GF		496-515	2	1.1		3.55	
			GF	GF/HS/SQ	618-631	2	1.0	0.7	4.27	3.82
			GF		703-713	2	1.0		4.30	

NCBI Nr. <sup>a</sup>	AGI Acc Nr. <sup>b</sup>	Proteinname und AtDB-Annotierung	Isolationsmethode <sup>c</sup>		Position <sup>d</sup>	Z <sup>e</sup>	$\Delta M^f$		$X_{corr}^g$	
			Arabidopsis	Sinapis			Arabidopsis	Sinapis	Arabidopsis	Sinapis
gi 18408237	At1g65260	PTAC4 ( <i>PspA/IM30 family protein</i> )	GF	GF	84-98	2		0.7		3.10
			GF	GF	99-113	2		-0.4		5.19
			GF	GF	116-126	2		0.2		3.54
			GF	GF	146-152	1		0.2		1.71
			GF	GF	166-176	2		0.1		3.47
			GF	GF	167-176	2		-0.5		3.43
			GF	GF	184-194	2		-0.1		3.13
			GF	GF	223-241	2		0.5		5.91
			GF	GF	246-267	2		1.1		5.08
			GF	GF	268-284	3		-0.5		4.35
			GF	GF	313-324	2		0.1	4.58	
gi 15236331	At4g13670	PTAC5 ( <i>peptidoglycan-binding domain-containing protein</i> )	GF	GF	80-92	2	-0.1	-0.6	4.78	4.40
			GF	GF	221-229	2		-0.1		2.96
gi 18395008	At1g21600	PTAC6 ( <i>expressed protein</i> )	GF	GF	83-112	2	1.1		6.16	
			GF	GF	113-129	2	-0.3		3.21	
			GF	GF	149-161	2	1.0		3.06	
			GF	GF	162-177	2	1.1		2.84	
			GF	GF	232-250	2	0.8		5.19	
gi 22327025	At5g24314	PTAC7 ( <i>expressed protein</i> )	GF	GF	64-72	2		0.6		2.73
			GF	GF	80-91	2	-0.8		4.50	
			GF	GF	96-112	2	0.9		2.80	
			GF	GF	132-161	2	0.7		4.79	
gi 18407178	At2g46820	PTAC8 ( <i>expressed protein</i> )	GF	GF	64-88	2	1.0		4.80	
			GF	GF	127-148	2	-0.2		3.96	
gi 18415421	At4g20010	PTAC9 ( <i>expressed protein</i> )	GF	GF	121-130	2	1.5	0.0	2.63	3.59
			GF	GF	288-299	2		0.7		3.47
gi 15228384	At3g48500	PTAC10 ( <i>hypothetical protein</i> )	GF	GF	41-56	2	0.7		3.36	
			GF	GF/HS	77-93	2	-1.1	0.6	3.87	3.73

NCBI Nr. <sup>a</sup>	AGI Acc Nr. <sup>b</sup>	Proteinname und AtDB-Annotierung	Isolationsmethode <sup>c</sup>		Position <sup>d</sup>	Z <sup>e</sup>	$\Delta M^f$		$X_{\text{corr}}^g$	
			Arabidopsis	Sinapis			Arabidopsis	Sinapis	Arabidopsis	Sinapis
			GF		95-114	2	0.2		4.61	
			GF		127-138	2	0.9		3.04	
			GF		244-252	2	0.2		2.67	
			GF		354-362	2	-0.3		2.69	
			GF		404-424	2	0.6		5.64	
			GF		444-453	2	0.4		3.35	
			GF		468-478	2	0.1		3.86	
			GF		503-515	2	-0.3		4.35	
			GF	GF	532-543	2	0.3	0.2	3.22	2.63
			GF		553-571	2	-0.3		5.68	
gij15227028	At2g02740	PTAC11 ( <i>hypothetical protein</i> )	GF		69-84	2	0.7		3.02	
			GF	GF	96-103	2		0.0		2.58
			GF		133-146	2	0.8		3.99	
gij15226791	At2g34640	PTAC12 ( <i>unknown protein</i> )	GF		106-121	2		0.6		2.66
			GF		127-142	2		0.6		4.41
			GF		190-206	2	0.1		3.03	
			GF		225-240	2	0.6		3.30	
			GF		280-294	2	0.3		4.79	
			GF		340-362	3	0.2		4.65	

**Tabelle 9:** Nach Aufnahme von MS/MS-Spektren identifizierte Proteine in TAC-Frakturen isoliert aus *Arabidopsis thaliana* und *Sinapis alba*. Die Analysen der MS/MS-Spektren erfolgte gegen eine *Arabidopsis*-Datenbank ([ftp.arabidopsis.org/home/tair/Sequences/blast\\_datasets/](ftp.arabidopsis.org/home/tair/Sequences/blast_datasets/)).

<sup>a</sup> NCBI, Zugangsnummer

<sup>b</sup> AGI Accession, Genlokus

<sup>c</sup> Isolationsmethode zur Anreicherung des TAC mit der das Protein identifiziert wurde

GF, Gelfiltrationschromatographie

HS, Heparin-Sepharose-Chromatographie

SQ, Q-Sepharose-Chromatographie

<sup>d</sup> Peptidposition innerhalb des korrespondierenden Proteins

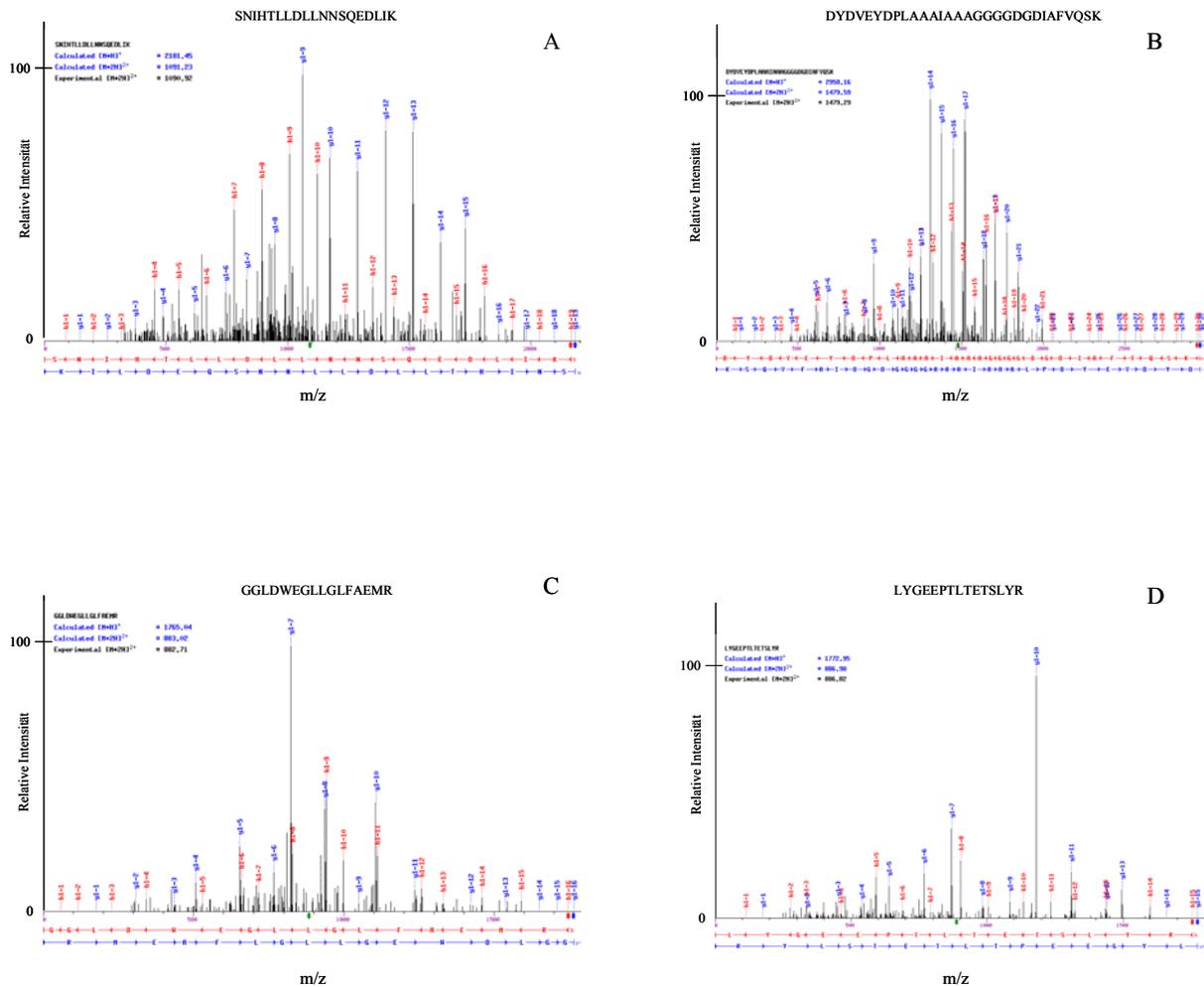
<sup>e</sup> Ladungszustand des Peptides

<sup>f</sup> Differenz der gemessenen Masse zur theoretischen Masse

<sup>g</sup> Korrelationsfaktor basierend auf dem Sequestalgorithmus

AtDB, Arabidopsis-Datenbank (in englisch); PTAC, Protein im TAC

In Abb. 5 sind ausgewählte MS/MS-Spektren dargestellt, die die Signifikanz der identifizierten Proteine veranschaulichen sollen. Hierfür wurde jeweils das MS/MS-Spektrum des Peptides höchster Intensität abgebildet.



**Abbildung 4:** MS/MS-Spektren ausgewählter Ionen. Die gemessenen Ionen sind theoretischen b-Typ-(N-terminal, rot) und y-Typ-(C-terminal, blau) Fragmenten zugeordnet. Die mittels Turbo Sequest (*revision* 2.0; Thermo, San Jose, USA) ermittelte Peptidsequenz ist oberhalb der korrespondierenden Spektren abgebildet: **(A)**  $[M+2H]^{2+}$  1090.92 (*RNA polymerase alpha chain*); **(B)**  $[M+2H]^{2+}$  1479.29 (PTAC6); **(C)**  $[M+2H]^{2+}$  882.71 (PTAC2) und **(D)**  $[M+2H]^{2+}$  886.82 (PTAC12).

Neben den in Tab. 8 aufgeführten Proteinen wurden weitere Proteine identifiziert, die jedoch auf Grund ihrer Funktion als Kontaminationen zu interpretieren sind. Solchermaßen wurden nachstehende Proteine ausgeschlossen:

- (i) Photosynthesepoteine
- (ii) plastidäre Biosynthesepoteine
- (iii) nicht plastidenlokalisierte Proteine

Darunter befinden sich v. a. stark exprimierte chloroplastidäre Membranproteine. Des Weiteren wurden ein mitochondriales Protein sowie zwei nukleäre Histonproteine detektiert (Tab. 9).

Protein <sup>a</sup>	Genlokalisierung <sup>b</sup>	Kompartiment <sup>c</sup>
<b>Photosynthese</b>		
<i>light-harvesting chlorophyll a/b binding proteins</i>	Nukleus	Chloroplast
<i>photosystem II protein D2</i>	Chloroplast	Chloroplast
<i>photosystem II protein D1</i>	Chloroplast	Chloroplast
<i>photosystem II 44 kDa protein</i>	Chloroplast	Chloroplast
<i>putative component of cytochrome B6-F complex</i>	Nukleus	Chloroplast
<i>ATP synthase CF1 beta chain</i>	Chloroplast	Chloroplast
<i>ATPase alpha subunit</i>	Chloroplast	Chloroplast
<b>Biosynthese, Metabolismus</b>		
<i>ribulose-bisphosphate carboxylase activase, putative</i>	Nukleus	Chloroplast
<i>dihydrolipoamide dehydrogenase, putative</i>	Nukleus	Chloroplast
<i>dihydrolipoamide S-acetyltransferase, putative</i>	Nukleus	Chloroplast
<i>dihydrolipoamide S-acetyltransferase protein</i>	Nukleus	Chloroplast
<i>Mur ligase family protein</i>	Nukleus	Chloroplast
<i>heme oxygenase 2 (HO2) protein</i>	Nukleus	Chloroplast
<i>glycosyl hydrolase family 1 protein</i>	Nukleus	unbekannt
<i>adenylate translocator protein</i>	Nukleus	Mitochondrium
<b>Chromosomenorganisation</b>		
<i>histone H2A, putative</i>	Nukleus	Nukleus
<i>histone H4</i>	Nukleus	Nukleus

**Tabelle 9:** In TAC-Fractionen identifizierte Proteine, die auf Grund ihrer Funktion bzw. Kompartimentierung keine weitere Berücksichtigung fanden.

<sup>a</sup> englische Bezeichnung des Proteins in der *Arabidopsis*-Datenbank

<sup>b</sup> Kodierungsort des Gens

<sup>c</sup> Proteinlokalisierung

### 1.2.2 Identifizierung der TAC-Proteine nach Affinitäts- bzw. Ionenaustausch-Chromatographie

Proteine des TAC aus *Sinapis alba* sind mit weiteren chromatographischen Methoden angereichert und ebenfalls massenspektrometrisch untersucht worden. Dazu wurde das nach einem Gelfiltrationsschritt isolierte TAC einer Affinitätschromatographie an Heparin-Sepharose- bzw. einer Ionenaustauschchromatographie an Q-Sepharose unterzogen. In Tab. 8 sind identifizierte Proteine dieser Fraktionen und die angewandten biochemischen Methoden, mit denen die jeweiligen Peptide detektiert wurden, angegeben.

Beide biochemische Methoden führten nicht zur Identifizierung neuer Komponenten. Im Fall der Ionenaustauschchromatographie an Q-Sepharose konnte neben Untereinheiten der RNA-Polymerase nur PTAC3 (*SAP domain-containing protein*, At3g04260) eindeutig identifiziert werden. Mit Hilfe der Affinitätschromatographie an Heparin-Sepharose wurden aus zuvor durch Gelfiltration angereichertem TAC erfolgreich DNA/RNA-bindende Proteine isoliert. Dazu gehören Untereinheiten der RNA-Polymerase, DNA-Polymerase A (At3g20540), beide Gyrasen (At3g10270 und At3g10690) sowie der Elongationsfaktor EF-Tu (At4g20360). Weiterhin wurden in dieser Fraktion Proteine unbekannter Funktion nachgewiesen, die entsprechend computerbasierender Analysen mittels InterPro Scan (Apweiler *et al.*, 2000), PROSITE (Falquet *et al.*, 2002) und Pfam (Sonnhammer *et al.*, 1997; Bateman *et al.*, 2000) DNA/RNA-Bindemotive, wie PPR, SMR, SAP und S1 aufweisen (Tab. 11). Unter diesen Proteinen befinden sich PTAC2 (At1g74850), PTAC3 (At3g04260) und PTAC10 (At3g48500).

### 1.2.3 Identifizierung der TAC-Proteine nach SDS-PAGE

Durch zwei Gelfiltrationssäulen angereicherte TAC-Fraktionen von Chloroplasten aus *Sinapis alba* wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt (Abb. 4), nach Silberfärbung die sichtbaren Proteinbanden ausgeschnitten und mit Trypsin im Gel verdaut. Die Proteine kamen schließlich im ESI-IONTRAP zur Analyse. Dabei konnten ein weiteres Protein (At2g05430) und dreizehn der im Komplex identifizierten Proteine nachgewiesen werden (Tab. 10). Die voneinander abweichenden theoretischen Molekulargewichte bei Senf- und *Arabidopsis*-

Proteinen können auf artspezifischen Unterschieden, Degradation und/oder Modifikation derselben beruhen.

Bande	MG <sup>a</sup> [kDa]	Protein <sup>b</sup>	Position <sup>c</sup>	Z <sup>d</sup>	ΔM <sup>e</sup>	X <sub>corr</sub> <sup>f</sup>	Zugangsnummer <sup>e</sup>		
1	19-21	ThR ( <i>thioredoxin, putative</i> )	79-90	2	-0.2	4.35	gi 15230779		
			80-90	2	-0.5	4.04			
			148-161	2	-0.1	4.16			
		<i>histone H4</i>	61-68	2	-0.6	2.53	gi 15226944		
			69-78	2	-1.3	3.16			
		<i>histone H3</i>	174-180	1	0.2	2.55	gi 9369379		
2	22-23	ThR ( <i>thioredoxin, putative</i> )	132-142	2	-0.2	2.50	gi 15230779		
			<i>histone H3</i>	174-180	1	0.4		1.94	
				218-223	1	0.9			
3	24-25	<i>hypothetical protein (At2g05430)</i>	140-156	2	-1.2	2.50	gi 15224529		
4	26-28	?							
5	30-32	<i>hypothetical protein (At2g05430)</i>	140-156	2	-0.4	2.51	gi 15224529		
6	33-35	<i>hypothetical protein (At2g05430)</i>	140-156	2	-0.9	2.70	gi 15224529		
7	36-38	<i>ATP synthase CF1 beta chain</i>	179-191	2	-1.1	3.05	gi 7525040		
8	39-40	PTAC1 ( <i>DNA-binding protein-related</i> )	248-263	2	-1.5	2.93	gi 15223748		
9	42-44	PTAC1 ( <i>DNA-binding protein-related</i> )	81-89	2	-0.7	2.55	gi 15223748		
			181-199	2	1.2	3.78			
		PTAC11 ( <i>hypothetical protein</i> )	85-93	2	-0.7	2.55	gi 15227028		
10	54-55	<i>superoxide dismutase [Fe], putative</i>	253-262	2	-0.4	2.92	gi 15241373		
			<i>pfkB-type carbohydrate kinase family protein</i>	578-597	2	2.70		-0.2	gi 15222232
			<i>ATP synthase CF1 beta chain</i>	278-291	2	-0.8		3.72	gi 7525040
				292-312	2	0.8		2.92	
11	60-62	<i>RNA polymerase beta'' chain</i>	1083-1091	2	-0.7	3.22	gi 7525023		
			PTAC9 ( <i>expressed protein</i> )	121-130	2	-0.1		3.20	
				288-299	2	-0.1		3.12	
12	70-72	PTAC6 ( <i>expressed protein</i> )	189-208	2	-0.2	3.36	gi 18395008		
			149-161	2	-0.5	3.02			
			209-213	1	0.0	1.62			
			273-279	1	0.3	1.54			
		<i>pfkB-type carbohydrate kinase family protein</i>	146-160	2	-0.6	3.20	gi 15232415		
			165-170	1	0.2	1.57			
13	78-80	<i>RNA polymerase beta' chain</i>	327-341	2	-0.7	3.28	gi 7525024		
			461-474	2	-1.4	4.02			

Bande	MG <sup>a</sup> [kDa]	Protein <sup>b</sup>	Position <sup>c</sup>	Z <sup>d</sup>	$\Delta M^e$	X <sub>corr</sub> <sup>f</sup>	Zugangsnummer <sup>e</sup>
			595-605	2	-1.0	3.01	
		PTAC6 ( <i>expressed protein</i> )	149-161	2	-0.7	2.69	gi 18395008
		<i>hypothetical protein</i> (At2g05430)	140-145	2	0.0	2.60	gi 15224529
14	82-84	PTAC10 ( <i>hypothetical protein</i> )	609-622	2	-1.0	2.52	gi 15228384
15	85-87	PTAC5 ( <i>peptidoglycan-binding domain-containing protein</i> )	80-92	2	-1.0	3.26	gi 15236331
16	88-91	PTAC5 ( <i>peptidoglycan-binding domain-containing protein</i> )	80-92	2	-0.2	3.56	gi 15236331
17	95-100	?					
18	135-145	PTAC10 ( <i>hypothetical protein</i> )	41-46 95-114	2 2	-0.3 0.7	3.18 3.47	gi 15228384
19	150-160	PTAC3 ( <i>SAP domain-containing protein</i> )	703-713 618-631	2 2	-0.3 0.2	2.85 4.22	gi 15229259
		<i>RNA polymerase beta" chain</i>	1083-1091 1144-1151 1206-1214	2 2 2	0.0 -0.5 1.1	2.63 2.91 2.53	gi 7525023
20	165-175	<i>DNA-dependent RNA polymerase subunit beta</i>	646-977	2	-0.2	3.29	gi 7525025
		<i>RNA polymerase beta" chain</i>	138-150 266-276 511-525 1144-1151	2 2 2 2	-0.3 -0.2 -0.1 -0.6	3.29 2.53 3.09 2.74	gi 7525023

**Tabelle 10:** Identifizierte Peptide aus TAC-Fraktionen aus *Sinapis alba* nach SDS-PAGE

<sup>a</sup> Molekulargewichtsbereich

<sup>b</sup> Identifiziertes Protein (englische Bezeichnung nach NCBI)

<sup>c</sup> Peptidposition innerhalb des korrespondierenden Proteins

<sup>d</sup> Ladungszustand des Peptides

<sup>e</sup> Differenz der gemessenen Masse zur theoretischen Masse

<sup>f</sup> Korrelationsfaktor basierend auf dem Sequestalgorithmus

<sup>g</sup> Zugangsnummer des korrespondierenden Proteins

### 1.3 Datenbankanalysen putativer Proteine

Zur Strukturuntersuchung wurden die im TAC identifizierten Proteine unbekannter Funktion mit den Programmen InterPro Scan (Apweiler *et al.*, 2000), PROSITE (Falquet *et al.*, 2002) und Pfam (Sonnhammer *et al.*, 1997; Bateman *et al.*, 2000) auf bekannte Proteindomänen analysiert. Da es sich ausschließlich um kernkodierte Proteine handelt, wurden darüber hinaus

Vorhersagen zur plastidären Transitsequenz mittels Predotar (Small *et al.*, 2004), ChloroP und TargetP (Emanuelsson *et al.*, 1999; 2000) getroffen. Die dabei ermittelten Motive und Transitsequenzen sind in Tab. 11 zusammengestellt. Zusätzlich sind in dieser Tabelle sequenzähnliche Proteine erfasst, die durch computergestützte Analysen mit BLASTP (Altschul *et al.*, 1997) gefunden wurden.

Gemäß datenbankbasierenden Ermittlungen theoretischer Transitpeptide sind für die untersuchten Proteine chloroplastidäre Transitsequenzen vorhergesagt. Entsprechend den Transitsequenzen und Proteinstrukturen (z. B. Hydrophobizität; Daten nicht gezeigt) handelt es sich bei diesen Proteinen mit großer Sicherheit um stromale Proteine. Für PTAC9 sind keine deutlichen Lokalisationsvorhersagen möglich (Tab. 11).

Mit den aktuell verfügbaren Programmen zur Untersuchung der Proteinstruktur konnten nicht für alle im TAC identifizierten Proteine bekannte Motive ermittelt werden. Unter den ermittelten Proteindomänen sind v.a. DNA/RNA-Bindemotive vorzufinden. So konnten folgende Bindemotive für Nukleinsäuren gefunden werden: PPR (*pentatricopeptide repeat*), SAP, S1 und SMR (*small MutS-related domain*). Andere Domänen der PTAC-Proteine wie TPR (*tetratricopeptide repeat*) und DnaJ spielen bei Protein-Protein-Interaktionen eine Rolle (Silver und Way, 1993; Blatch und Lässle, 1999).

Bei der PPR-Domäne handelt es sich um eine im Pflanzenreich sehr verbreitete Sequenzwiederholung von 35 Aminosäuren in bis zu 18 Kopien (Small und Peeters, 2000; Lurin *et al.*, 2004). Zu dieser Gruppe gehören beispielsweise CRP1 und PGR3. Beide sind an posttranskriptionaler Regulation der plastidären Genexpression beteiligt: CRP1 an RNA-Prozessierung (Fisk *et al.*, 1999) und PGR3 an RNA-Stabilisierung (Yamazaki *et al.* 2004). Das im TAC identifizierte, die PPR-Motive enthaltende Protein PTAC2 weist 15 solche Sequenzwiederholungen, eine SMR-Domäne, zwei TPR-Motive sowie eine Prenyltransferase-Domäne auf (s. unter 2.2). SMR-Motive zeigen Homologien zu *E. coli* MutS-Genen. Mitglieder dieser weit verbreiteten Genfamilie umfassen Proteine, die an DNA-Reparaturmechanismen beteiligt sind (Modrich und Lahue, 1996; Moreira und Philippe, 1999). Homologe Vertreter der MutS-Familie spielen bei Chromosomensegregations- und *Crossing-over*-Ereignissen eine Rolle (Ross-Macdonald und Roeder, 1994; Eisen, 1998). Die TPR-Domäne ist ebenfalls eine verbreitete Sequenzwiederholung von 3 bis 16 Kopien, jeweils bestehend aus mindestens 34 Aminosäuren (Lamb und Tugendreich, 1995). TPR-Strukturen vermitteln Protein-Protein-Interaktionen (Das *et al.*, 1998; Blatch und Lässle, 1999)

sowie die Assemblierung von Multiproteinkomplexen (D'andrea und Regan, 2003). So sind beispielsweise in Sojabohnen TPRs an der Assemblierung des HSP70/HSP90 Multi-Chaperone-Komplexes beteiligt (Zhang *et al.*, 2003). Weiterhin ist eine Prenyltransferase-Domäne auszumachen. Bekannte Proteine mit derartigen Domänen sind Prenyltransferasen, die den Transfer von Prenylgruppen auf C-terminale Cysteinreste wichtiger Komponenten verschiedener Signaltransduktionsprozesse katalysieren (Zhang und Casey, 1996; Long *et al.*, 2001).

Das SAP-Motiv des PTAC3 ist ein weiteres DNA-Bindemotiv, das im Zusammenhang mit DNA-Reparatur (Goffeau *et al.*, 1996; Johnston *et al.*, 1997) sowie nukleärer Chromosomenorganisation beschrieben wurde (Gohring *et al.*, 1997; Aravind und Koonin, 2000). Eine bekanntes Protein mit einer SAP-Domäne ist das RAD18 Protein, dass in *Saccharomyces cerevisiae* für postreplikative Reparaturen durch UV beschädigter DNA verantwortlich ist (Bailly *et al.*, 1997).

Darüber hinaus wurde eine RNA-Bindedomäne in PTAC10 identifiziert. Dieses Motiv wurde ursprünglich im ribosomalen Protein S1 in *E. coli* entdeckt (Subramanian, 1983). Durch Interaktion mit Ribosomen und spezifischen mRNA-Sequenzen stromabwärts der Ribosomenbindungsstelle ermöglichen S1 Proteine gramnegativer Bakterien die Translationsinitiation (Boni *et al.*, 1991). S1-Domänen wurden bereits in anderen RNA-assoziierten Proteinen gefunden, wobei die Anzahl der S1-Motive verschiedener Proteine variiert.

Auf Grund der hohen Homologie zu p24 sind PTAC1 und PTAC11 möglicherweise weitere nukleinsäurenbindende TAC-Komponenten. Im Kern übernehmen sie wichtige Aufgaben der Transkription (Desveaux *et al.*, 2002).

Das PspA/IM30-Protein (PTAC4) ist seiner Struktur nach ein Vertreter der PsaA-Familie, die viele Mitglieder gleicher evolutionärer Herkunft (Westphal *et al.*, 2001) aber unterschiedlicher Funktion umfasst. So ist das PsaA-Protein von *E. coli* ein Suppressor der  $\sigma^{54}$ -abhängigen Transkription (Dworkin *et al.*, 2000). Weitere PspA-Homologe sind: das Kälteschock-Protein PspB aus *Bacillus subtilis* (Graumann *et al.*, 1996), das membranassoziierte Protein IM30 aus *Pisum sativum* (Li *et al.*, 1994) sowie das homologe *Arabidopsis*-Protein Vipp1, das wesentlich an der Thylakoidbiogenese beteiligt ist (Kroll *et al.*, 2001).

Peptidoglykan-Bindedomänen, wie z. B. bei PTAC5, sind für Enzyme charakteristisch, die an Zellwandbiosynthesen beteiligt sind (Foster, 1991). PTAC5 besitzt außerdem ein DnaJ-Motiv. Letztere ermöglichen spezifische Proteininteraktionen, wie es für DnaJ und DnaJ-homologe

---

Proteine in *E. coli* bzw. *S. cerevisiae* gezeigt werden konnte (Liberek *et al.*, 1991; Silver und Way, 1993; Cyr *et al.*, 1994).

Zur Funktion der DUF731-Domäne des PTAC9-Proteins kann bisher keine Aussage getroffen werden.

Genlokus <sup>a</sup>	Proteinname und AtDB- Annotierung <sup>b</sup>	Sequenz- abdeckung <sup>c</sup>	Proteindomäne <sup>d</sup>	Lokalisation		Ähnliche Proteine <sup>h</sup>	
				Predotar <sup>e</sup>	TargetP <sup>f</sup>		ChloroP <sup>g</sup>
At1g14410	PTAC1 ( <i>DNA-binding protein-related</i> )	41.4%	keine	P (0.916)	47-48/ 0.654	47-48/ 0.579	AAF91282 [Solanum tuberosum] <i>similar to DNA-binding protein p24</i> Identisch = 147/215 (68%) Positiv = 179/215 (83%)  NP_178377 [At2g02740; Arabidopsis thaliana] <i>putative transcription factor</i> Identisch = 214/273 (78%) Positiv = 239/273 (87%)
At1g74850	PTAC2 ( <i>pentatricopeptide repeat-containing protein</i> )	10.0%	MutS PPR TPR	P (0.704)	66-67/ 0.821	66-67/ 0.542	NP_910039 [Oryza sativa] <i>putative chloroplast RNA processing protein</i> Identisch = 435/800 (54%) Positiv = 589/800 (73%)
At3g04260	PTAC3 ( <i>SAP domain-containing protein</i> )	19.4%	SAP	P (0.994)	29-30/ 0.971	29-30/ 0.467	AAM93724 [Oryza sativa] <i>putative chloroplast RNA processing protein</i> Identisch = 400/558 (71%) Positiv = 466/558 (83%)
At1g65260	PTAC4 ( <i>PspA/IM30 family protein</i> )	42.1%	PspA/IM30	P (0.996)	64-65/ 0.965	64-65/ 0.594	NP_915144 [Oryza sativa] <i>putative chloroplast membrane-associated 30 kD protein</i> Identisch = 200/298 (67%) Positiv = 232/298 (77%)
At4g13670	PTAC5 ( <i>peptidoglycan-binding domain-containing protein</i> )	5.1%	peptidoglykanbinde Domäne DnaJ bZIP	M (0.661) P (0.423)	40-41 0.900	40-41/ 0.569	CAE01911 [Oryza sativa] Identisch = 129/210 (61%) Positiv = 164/210 (78%)

Genlokus <sup>a</sup> Annotierung <sup>b</sup>	Proteinname und AtDB- Sequenz- abdeckung <sup>c</sup>	Proteindomäne <sup>d</sup>	Lokalisation		Ähnliche Proteine <sup>h</sup>	
			Predotar <sup>e</sup>	TargetP <sup>f</sup> ChloroP <sup>g</sup>		
At1g21600	PTAC6 ( <i>expressed protein</i> ) 29.0%	keine	P (0.928)	59-60/ 0.802	59-60/ 0.566	keine Ähnlichkeit
At5g24314	PTAC7 ( <i>expressed protein</i> ) 42.2%	keine	P (0.817)	32-33/ 0.899	32-33/ 0.506	NP_916530 [ <i>Oryza sativa</i> ] Identisch = 65/109 (59%) Positiv = 84/109 (77%)
At2g46820	PTAC8 ( <i>expressed protein</i> ) 27.0%	keine	P (0.857)	45-46/ 0.966	11-12/ 0.422	BAC83086 [ <i>Oryza sativa</i> ] Identisch = 51/92 (55%) Positiv = 65/92 (70%)
At4g20010	PTAC9 ( <i>expressed protein</i> ) 5.9%	DUF731	keine Voraussage	?/ 0.254	20-21/ 0.467	AAC79142 [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ] Identisch = 206/369 (55%) Positiv = 246/369 (66%)
At3g48500	PTAC10 ( <i>hypothetical protein</i> ) 25.3%	S1	P (0.836)	40-41/ 0.791	40-41/ 0.549	CAB88331 [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ] Identisch = 430/495 (86%) Positiv = 436/495 (88%)  NP_915207 [ <i>Oryza sativa</i> ] Identisch = 317/571 (55%) Positiv = 396/571 (69%)
At2g02740	PTAC11 ( <i>hypothetical protein</i> ) 19.8%	keine	keine Voraussage	75-76/ 0.647	75-76/ 0.560	NP_178377 [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ] <i>putative transcription factor</i> Identisch = 111/111 (100%) Positiv = 111/111 (100%) Identisch = 63/165 (38%) Positiv = 79/165 (47%)

Genlokus <sup>a</sup>	Proteinname und AtDB- Annotierung <sup>b</sup>	Sequenz- abdeckung <sup>c</sup>	Proteindomäne <sup>d</sup>	Lokalisation		Ähnliche Proteine <sup>h</sup>
				Predotar <sup>e</sup>	TargetP <sup>f</sup> ChloroP <sup>g</sup>	
At2g34640	PTAC12 ( <i>unknown protein</i> )	21.4%	keine	P (0.990)	16-17/ 0.563	NP_172893 [Atlg14410; <i>Arabidopsis thaliana</i> ] <i>DNA-binding protein-related</i> Identisch = 76/123 (61%) Positiv = 90/123 (73%)
					16-17/ 0.478	NP_916296 [ <i>Oryza sativa</i> ] Identisch = 249/521 (47%) Positiv = 311/521 (59%)

**Tabelle 11:** Datenbankanalysen identifizierter Proteine. Durch ESI-MS/MS identifizierte, nicht charakterisierte Proteine wurden auf bekannte Proteindomänen und eine plastidäre Transitsequenz untersucht.

<sup>a</sup> AtDB, Arabidopsis-Datenbank (in englisch); PTAC, Protein im TAC

<sup>b</sup> korrespondierende Chromosomenposition

<sup>c</sup> Sequenzabdeckung der identifizierten Peptide innerhalb eines Proteins

<sup>d</sup> ermittelte Motive mit InterPro Scan, PROSIT und TIGRFAM

<sup>e</sup> Voraussetzungen zur Lokalisation und deren Wahrscheinlichkeit mit Predotar (P: Plastid; M: Mitochondrium)

<sup>f</sup> Transitsequenz nach TargetP und deren Wahrscheinlichkeit

<sup>g</sup> Lokalisation nach ChloroP und deren Wahrscheinlichkeit

<sup>h</sup> Proteine mit signifikanter Sequenzähnlichkeit (Bezeichnung in englisch)

Identisch, bezieht sich auf übereinstimmende Aminosäuren

Positiv, bezieht sich auf ähnliche Aminosäuren

## 2 Charakterisierung von Komponenten des TAC

### 2.1 Identifizierung von Mutanten

Um offenen Fragen der plastidären Transkription nachzugehen, bestand in der weiteren Arbeit großes Interesse an der Identifizierung neuer essentieller Proteine, die an regulatorischen Transkriptionsprozessen sowie posttranskriptionellen Modifikationen beteiligt sind. Dazu wurde ein Ansatz gewählt, bei dem mit *knock-out*-Mutanten gearbeitet wurde. Bei diesen Mutanten handelt es sich um T-DNA-Insertionsmutanten entsprechender Proteine, die im TAC identifiziert wurden (Tab. 8). Die *Arabidopsis*-Mutanten wurden über das *Nottingham Arabidopsis Stock Center* (NASC) bezogen. Schließlich sollte durch Untersuchungen der Genexpression in den Mutanten ermittelt werden, auf welcher Ebene ein Defekt vorliegt.

Bei diesem Ansatz konnten drei Linien isoliert werden, die im homozygoten Zustand im Vergleich zum WT eine visuell erkennbare Defizienz in ihrer Chlorophyllpigmentierung aufweisen (Tab. 12).

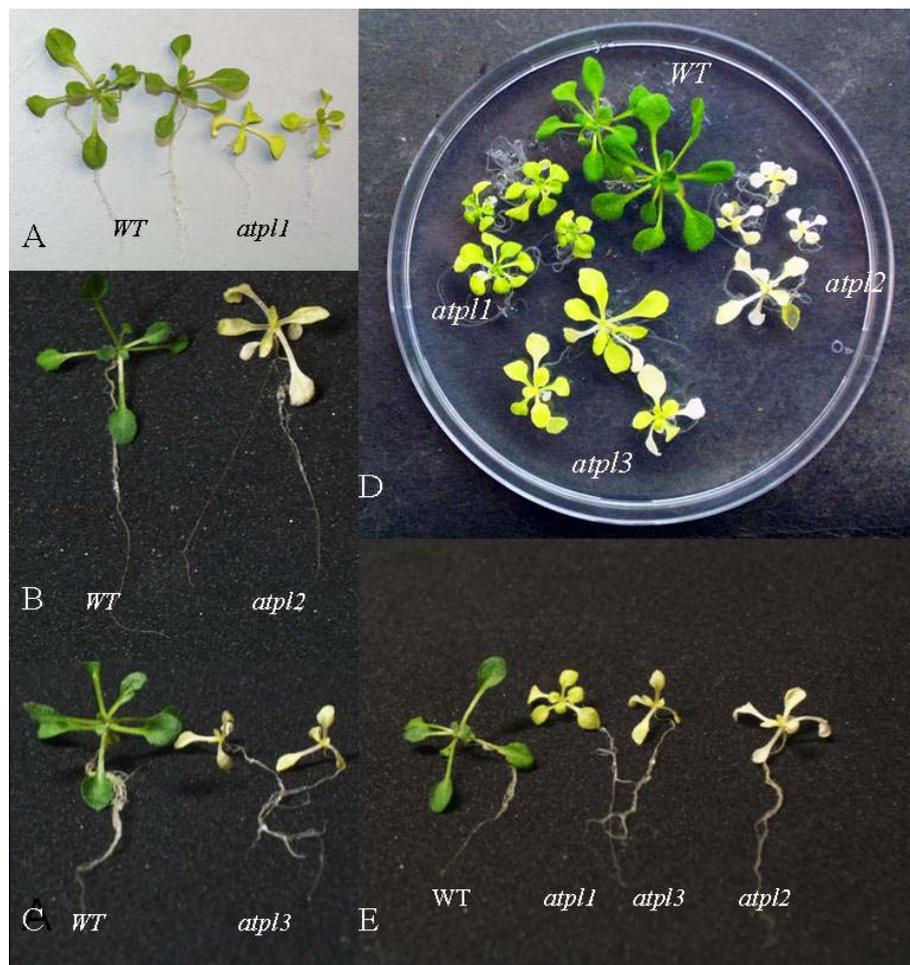
Genlokus	Genbezeichnung	<i>Salk</i> -Linie	Mutantenbezeichnung
At1g74850	<i>ptac2</i>	<i>Salk_075736</i>	<i>atpl1</i>
At1g21600	<i>ptac6</i>	<i>Salk_024431</i>	<i>atpl2</i>
At2g34640	<i>ptac12</i>	<i>Salk_025099</i>	<i>atpl3</i>

**Tabelle 12:** Über NASC bezogene *Salk*-Linien.

#### 2.1.1 Phänotypische Charakterisierung der Mutanten

Unter autotrophen Anzuchtbedingungen der Pflanzen bewirkt die T-DNA-Insertion in den korrespondierenden Genen At1g74850 (*ptac2*), At1g21600 (*ptac6*) und At2g34640 (*ptac12*) eine Keimlingsletalität. Nach Keimung homozygoter Mutanten entwickeln sich zunächst Pigment-defiziente Kotyledonen. Im weiteren Verlauf der Entwicklung werden keine Primärblätter gebildet. Hingegen entwickeln sie sich auf zuckerhaltigem MS-Medium zu Rosettenpflanzen, die im Vergleich zum WT deutlich kleiner sind und eine geringere

Chlorophyllpigmentierung aufweisen. Für homozygote *atpl1*-Pflanzen ist charakteristisch, dass sie zunächst gelbe Kotyledonen ausbilden. In ihrer weiteren Entwicklung werden grünliche Primär- und Folgeblätter angelegt (Abb. 6). Eine solche entwicklungsbedingte Pigmentierungsänderung konnte bei *atpl2* und *atpl3* nicht beobachtet werden.



**Abbildung 6:** Phänotyp von *atpl1*, *atpl2* und *atpl3* nach 12 (A, B, C und E) und 18 Tagen (D), gezogen unter Langtagsbedingungen auf MS-Medium.

Typischerweise bilden homozygote Mutanten beider letztgenannten Linien im Kotyledonenstadium verstärkt Anthocyane. Während sich aus *atpl3*-Keimlingen grünliche Pflanzen entwickeln, bleibt für *atpl2* die gelbliche Pigmentierung charakteristisch. Schoten

heterozygoter Pflanzen zeigen anhand der Samenpigmentierung eine mendelsche Segregation. In Abb. 6 sind homozygote Pflanzen der untersuchten Linien in unterschiedlichen Entwicklungsstadien dargestellt.

### 2.1.2 Segregationsanalysen der T-DNA-Linien

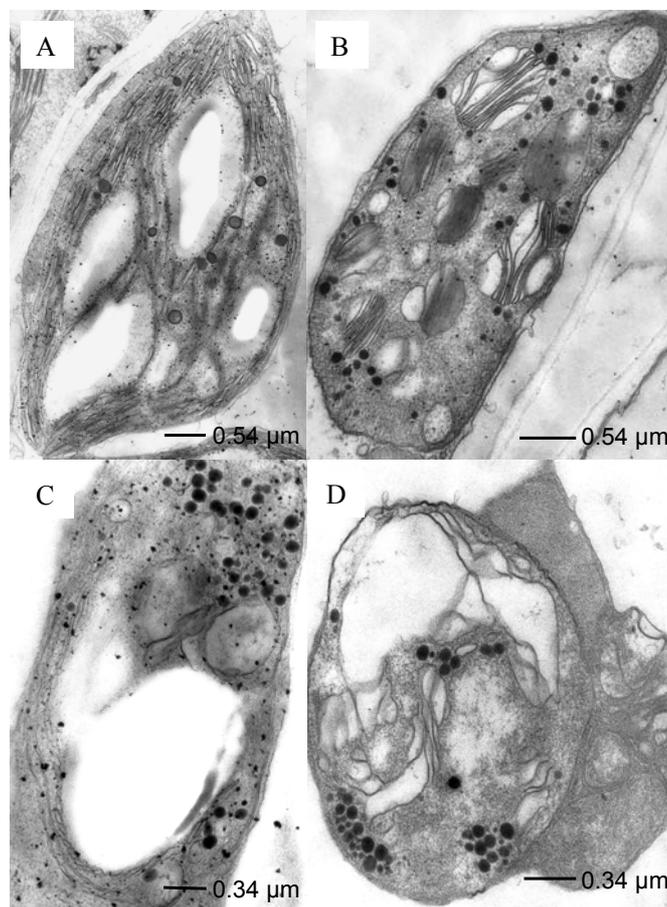
Zur Untersuchung der Kopienzahl der T-DNA im Genom der *Salk*-Linien wurden Segregationsanalysen der durch die Insertion bedingten bleichen Phänotypen sowie der vermittelten Kanamycinresistenz durchgeführt. Da es sich um rezessive nukleäre Mutationen handelt, ist eine Aufspaltung des Phänotyps von 1:3 (25% bleiche Pflanzen) und bezüglich der Kanamycinresistenz eine Aufspaltung von 3:1 (75% kanamycinresistent) zu erwarten. Entsprechende Aufspaltungsverhältnisse konnten in allen drei untersuchten Linien beobachtet werden (Tab. 13). Innerhalb der kanamycinresistenten Pflanzen befanden sich erwartungsgemäß ca. 33% mit einem bleichen Phänotyp. Aus diesen Daten kann geschlussfolgert werden, dass in den untersuchten Linien der Phänotyp sowie die Kanamycinresistenz an die Mutation gekoppelt ist.

Mutante	Anzahl	bleich %	WT %	$\chi^2$	Anzahl	Kana <sup>R</sup> %	Kana <sup>S</sup> %	$\chi^2$	bleich/ Kana <sup>R</sup> %	$\chi^2$
<i>atpl1</i>	1629	26.2	73.8	1.27	412	72.6	27.4	1.22	35.5	0.8
										7
<i>atpl2</i>	841	24.2	75.8	0.23	398	76.3	23.7	0.50	30.1	1.78
<i>atpl3</i>	768	22.8	77.2	1.99	425	74.6	25.4	0.05	31.1	1.06

**Tabelle 13:** Segregationsanalysen des Phänotyps und der Kanamycinresistenz. Bei  $\chi^2$ -Werten < 3.84 kann eine Kopplung des Phänotyps bzw. der Kanamycinresistenz an die Mutation mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% angenommen werden. S: sensitiv; R: resistent.

### 2.1.3 Ultrastrukturelle Analysen der Chloroplasten

Aus den Abbildungen Abb. 7A - D geht hervor, dass vielfältige ultrastrukturelle Veränderungen an den Membransystemen der Chloroplasten der Mutanten im Vergleich zum WT erfolgt sind. Während die Chloroplasten des WT (Abb. 7A) kaum thylakoidfreie Stromabereiche aufweisen, sind dicht gepackte Thylakoidzisternen in den Mutanten nur selten zu beobachten (Abb. 7A - D). Im WT sind neben dem Vorkommen von Stärkekörnern im Unterschied zu untersuchten Mutanten nur wenige Plastoglobuli im Stroma der Chloroplasten eingeschlossen.



**Abbildung 7:** Ultrastrukturelle Analysen der Plastiden: (A) WT; (B) *atp11*; (C) *atp12* bzw. (D) *atp13*. Die elektronenmikroskopischen Bilder wurden freundlicherweise von Dr. Fischer (Institut für Allgemeine Botanik, Friedrich-Schiller-Universität Jena) aufgenommen.

In *atpl1* sind Zisternen der nur in geringer Anzahl auftretenden Grana ungleich aufgeweitet. Besonders periphere Granathylakoide können zu weitleumigen Vesikeln aufgebläht sein. Enge, die Grana untereinander vernetzende Stromathylakoide fehlen. Es gibt keine Hinweise auf Ablagerung von Assimilationsstärke. Plastoglobuli treten herdförmig oder verstreut auf, von denen einige in engem Kontakt mit den o. g. Membranvesikeln stehen (Abb. 7B).

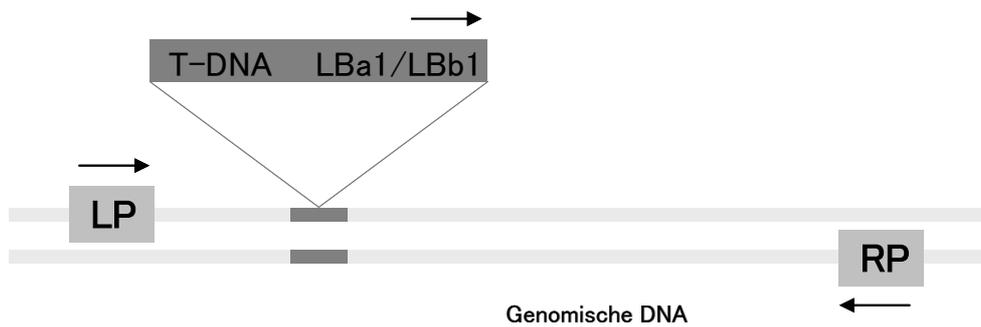
Chloroplasten von *atpl2* weisen keine Granastrukturen auf. An ihre Stelle treten Vesikel von ovaler Gestalt, die oftmals über die Hälfte des Chloroplastenlumens einnehmen. Hingegen durchziehen längere Stromathylakoide den peripheren Chloroplastenbereich – durch Zunahme von Stärkematerial im Zentrum an den Chloroplastenrand gedrängt. Es wird häufig eine Vielzahl von Plastoglobuli in räumlicher Nähe zu den o. g. vesikulären Gebilden beobachtet (Abb. 7C).

Eine spärliche Ausprägung des Thylakoidsystems tritt auch in *atpl3* auf. Membranstrukturen sind vorzugsweise in der Peripherie des Chloroplastenareals angeordnet. Besonders auffällig sind die abnorm aufgeweiteten Zisternen. Den weitaus größten Anteil des Stomas nehmen thylakoidfreie Bereiche ein. Eine Akkumulation von Speicherstärke wird nicht beobachtet. Plastoglobuli sind in größerer Anzahl herdförmig verteilt (Abb. 7D).

#### 2.1.4 Genotypische Analyse der T-DNA-Mutanten

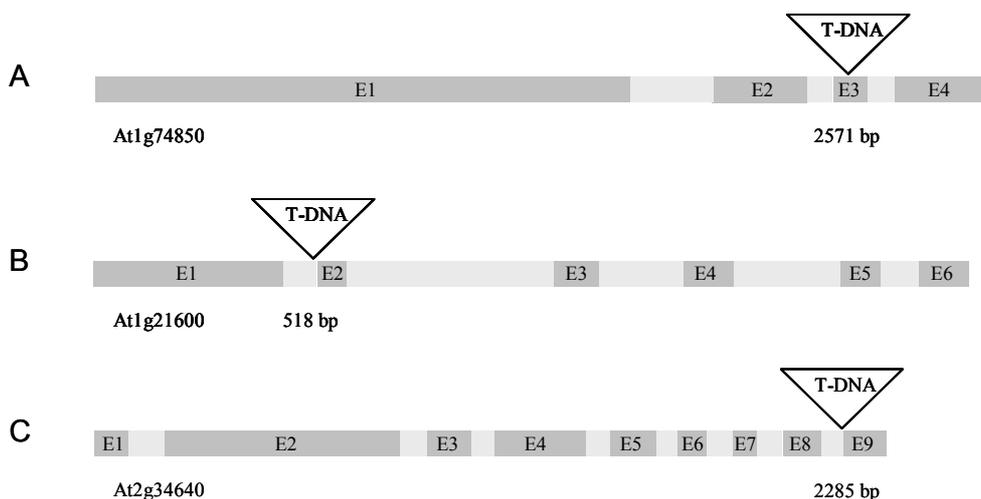
Die Unterscheidung der Insertionsmutanten vom WT auf molekularer Ebene erfolgte mit Hilfe der PCR-Amplifikation. Ein Amplifikat konnte nur in folgenden Fällen erhalten werden (Abb. 8):

- (i) Amplifikation benachbarter Sequenzbereiche der T-DNA-Insertion mit einem genspezifischen *Primer* (LP) in Kombination mit einem T-DNA-spezifischen *Primer* (LbA1 bzw. LbB1) bei homo- und heterozygoten Mutanten
- (ii) Amplifikation des WT-Allels mit zwei genspezifischen *Primern* (LP und RP) bei heterozygoten Mutanten und WT



**Abbildung 8:** Strategie zur Unterscheidung zwischen WT und Mutanten. RP: rechter genspezifischer *Primer*. LP: linker genspezifischer *Primer*. LBa1 bzw. LBb1: T-DNA-spezifische *Primer*.

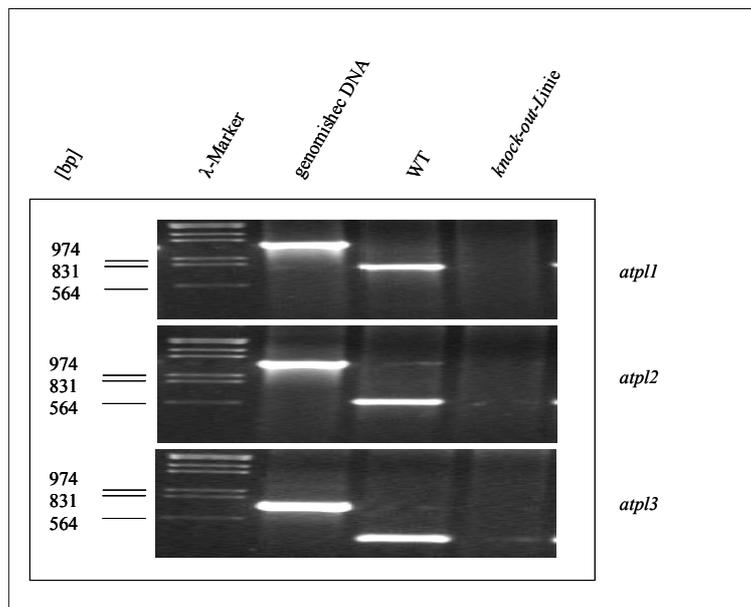
Zur Verifizierung der vom NASC-Institut angegebenen Insertionsstellen wurden die Amplifikate kloniert und sequenziert. Nach erhaltenen Sequenzdaten konnte rekonstruiert werden, dass die T-DNA in *ptac2* im 3. Exon zwischen der 2571. und 2572. Base vom 5'-Ende inseriert ist. Dagegen befindet sich die T-DNA in *ptac6* im 1. Intron nach der 518. Base. *Ptac12* trägt die Insertion im 8. Intron zwischen der 2285. und 2286. Base (Abb. 9).



**Abbildung 9:** Schema der T-DNA-Insertionsstellen. Die Anzahl der Basenpaare bezieht sich auf die Position der T-DNA zum 5'-Ende der Gene: (A) *ptac2* [At1g74850]; (B) *ptac6* [At1g21600] bzw. (C) *ptac12* [At2g34640].

### 2.1.5 Expression der genspezifischen mRNAs in den *knock-out*-Linien

Ein T-DNA enthaltendes Gen wird in seiner Struktur verändert und somit inaktiviert (Babiychuk *et al.*, 1997; Krysan *et al.*, 1999). Um den Effekt der T-DNA-Insertion auf die Genexpression der betreffenden Gene in den *Salk*-Linien zu untersuchen, wurde RT-PCR mit Gesamt-RNA aus homozygoten Mutanten und WT durchgeführt. Dabei kamen T-DNA eingrenzende Oligonukleotide zur Verwendung (Tab. 1). In WT-Pflanzen konnten Transkripte erwarteter Größe nachgewiesen werden (*ptac2*: 775 bp, *ptac6*: 587 bp und *ptac12*: 393 bp). Dagegen waren keine Transkripte in homozygoten Mutanten detektierbar (Abb. 10). Offensichtlich ist durch die T-DNA-Insertion eine Expression dieser Gene nicht möglich. Dass eine Kontamination der RNA mit genomischer DNA bestand, kann anhand der Fragmentgrößen ausgeschlossen werden, da nur Fragmente in Länge der cDNA amplifiziert worden sind.



**Abbildung 10:** RT-PCR Analysen mit Gesamt-RNA aus WT und homozygoten *Salk*-Mutanten. Nach Erststrangsynthese mit Oligo-(dT)-Nukleotiden folgte die PCR-Reaktion mit genspezifischen Oligonukleotiden. Zur Amplifikation von *ptac2*, *ptac6* und *ptac12* wurden 34, 30 bzw. 45 Zyklen durchgeführt. Als Kontrollreaktion wurde genomische DNA mit den gleichen genspezifischen Oligonukleotiden amplifiziert.

## 2.2 Strukturanalysen der Proteine

Mit Hilfe computergestützter Analysen (<http://us.expasy.org/tools/>) wurden Struktureigenschaften der TAC-Proteine PTAC2, PTAC6 und PTAC12 berechnet. Entsprechend diesen Strukturvorhersagen weisen die untersuchten Proteine hauptsächlich Helixstrukturen auf. Das bestimmte Molekulargewicht, der theoretische isoelektrische Punkt sowie die Proteinstruktur sind in Tab. 14 angegeben. Des weiteren erfolgte mittels InterPro Scan (Apweiler *et al.*, 2000), PROSITE (Falquet *et al.*, 2002) und Pfam (Sonnhammer *et al.*, 1997; Bateman *et al.*, 2000) eine Suche nach bekannten Proteindomänen. Dabei konnten für PTAC2 die beiden DNA/RNA-Bindemotive PPR und SMR sowie zwei TPR-Domänen identifiziert werden (s. unter 3.3). Die ermittelten Domänen und ihre Position innerhalb des Proteins sind in Tab. 14 zusammengefasst und in Abb. 11 schematisch dargestellt. PTAC6 und PTAC12 konnten keine bekannten Domänen zugeordnet werden.

Protein	MG <sup>a</sup>	Ip <sup>b</sup>	Struktur	TM <sup>c</sup>	Domäne	Position	E-Value <sup>d</sup>
PTAC2	96.3	5.67	Alpha_Beta	0	PPR	142-176	1.9e-08
					PPR	177-211	4.1e-10
					PPR	212-247	0.82
					PPR	248-282	1.7e-09
					PPR	283-317	0.00071
					PPR	318-352	5.9e-10
					PPR	353-387	2.5e-06
					PPR	388-422	5.7e-08
					PPR	423-457	0.0018
					PPR	458-492	0.024
					PPR	493-527	0.0079
					PPR	528-562	1.2e-05
					PPR	563-597	0.011
					PPR	598-631	0.57
					PPR	669-703	0.25
				TPR-like	268-415	4.5e-33	
				TPR-like	416-697	6.1e-27	

					SMR	710-798	5.6e-19
					Prenyltransferase	81-267	7.9e-25
PTAC6	37.4	4.82	All_Beta	0	-		
PTAC12	62.3	5.06	Alpha_Beta	0	-		

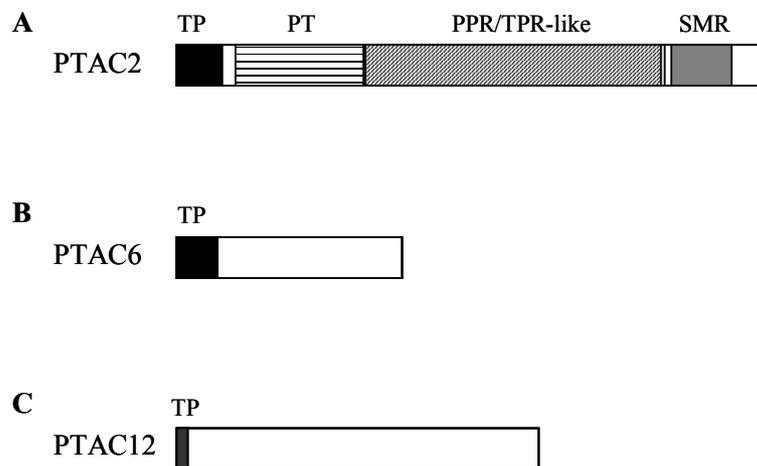
**Tabelle 14:** Struktureigenschaften und Proteindomänen.

<sup>a</sup> MG, Molekulargewicht

<sup>b</sup> Ip, Isoelektrischer Punkt

<sup>c</sup> TM, Anzahl der Transmembrandomänen

<sup>d</sup> Wahrscheinlichkeit der zufälligen Übereinstimmung der ermittelten Proteindomänen

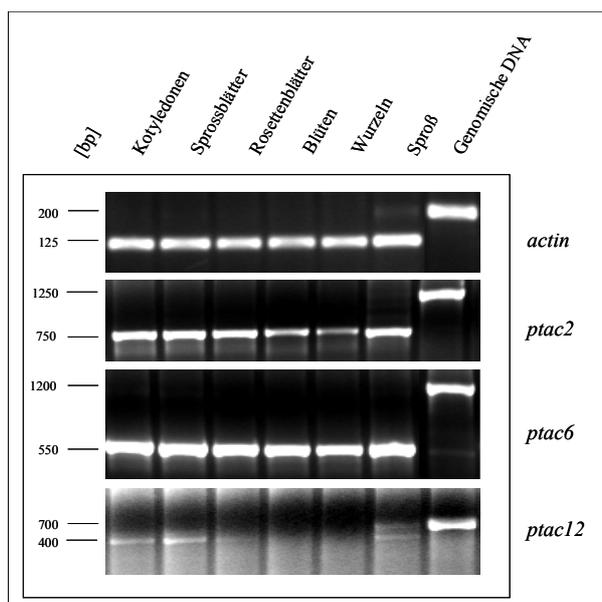


**Abbildung 11:** Schematische Darstellung der Proteinstruktur von: (A) PTAC2, (B) PTAC6 und (C) PTAC12. TP: Transitpeptid (schwarz). PT: Prenyltransferase (quer gestreift). PPR: *pentatricopeptide repeats* (hellgrau). TPR: *tetratricopeptide repeats* (schräg gestreift). SMR: *small MutS-related domain* (dunkelgrau).

### 2.3 Expression der genspezifischen mRNAs in verschiedenen Geweben von *Arabidopsis thaliana*

Zur Analyse der Expression der genspezifischen mRNAs wurde RT-PCR mit Gesamt-RNA aus Kotyledonen, Blüten, Wurzeln, Spross, Spross- und Rosettenblättern durchgeführt. Die nach Erststrangsynthese erhaltene cDNA wurde mit genspezifischen *Primer*-Paaren

amplifiziert (Tab. 1). Bei *ptac2* und *ptac6* konnten in allen Ansätzen cDNA-Fragmente erwarteter Längen erhalten werden. Das *ptac2*-Transkript (775 bp) wurde in Wurzeln mit geringerer Signalintensität nachgewiesen. Dagegen wird *ptac6* (587 bp) in allen Geweben etwa gleich stark exprimiert. Bei *ptac12* (393 bp) handelt es sich um ein sehr schwach exprimiertes Gen. Es wurden keine Transkripte in Blüten und Wurzeln detektiert. Die Signalstärke des Amplifikates mit der cDNA aus den physiologisch älteren Rosettenblättern ist im Vergleich zu den Sprossblättern geringer. Eine geringere Transkription von *ptac12* liegt offenbar auch im Sprossgewebe vor (Abb. 12). Aus den vorliegenden Daten lässt sich schlussfolgern, dass *ptac12* einer gewebespezifischen sowie entwicklungsbedingten Expression unterliegt. Indessen zeigen *ptac2* und *ptac6* ein konstitutives Expressionsmuster. Anhand der Längen der erhaltenen cDNA-Fragmente kann eine Kontamination der RNA mit genomischer DNA ausgeschlossen werden.

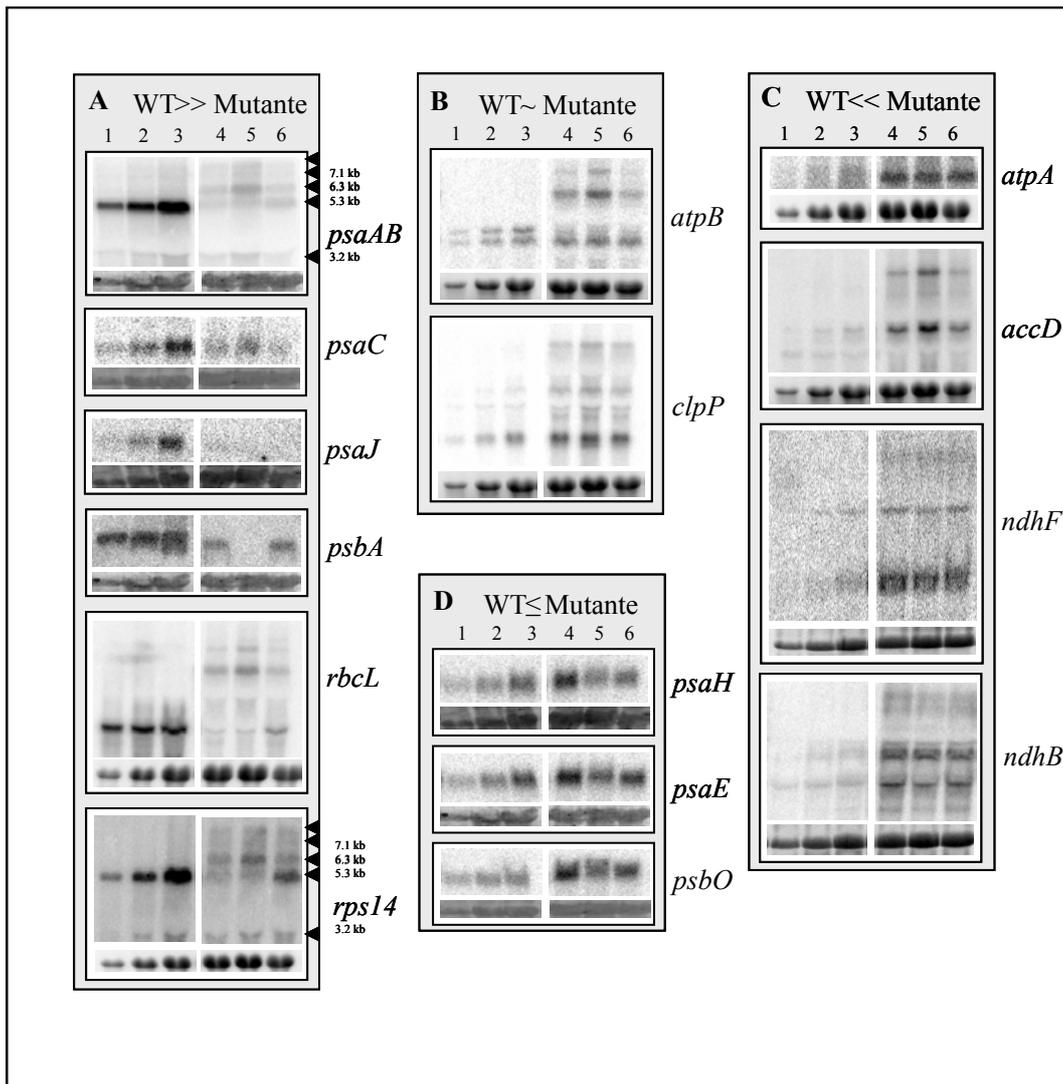


**Abbildung 12:** RT-PCR zur Untersuchung der gewebespezifischen Expression der mRNAs. Ausgehend von gleichen RNA-Konzentrationen erfolgte die Erststrangsynthese mit Oligo-(dT)-Nukleotiden und die anschließende PCR mit genspezifischen *Primern*. Zur Amplifikation von *ptac2* wurden 34, von *ptac6* 30 und *ptac12* 40 Zyklen eingesetzt. Als Referenz wurde Actin amplifiziert. Die PCR-Reaktion für Actin wurde über 23 Zyklen durchgeführt. Um eine Kontamination der cDNA mit genomische DNA auszuschließen, wurden für die Amplifikation von genomischer DNA die gleichen genspezifischen *Primer* eingesetzt.

## 2.4 Expressionsmuster plastidärer Gene im *steady state*

### 2.4.1 Akkumulationsanalysen plastidärer Transkripte mittels *Northern-blots*

Um zu untersuchen, ob die T-DNA-Insertionen in den Genen *ptac2*, *ptac6* und *ptac12* Auswirkungen auf die Akkumulation plastidärer Transkripte im *steady state* haben, wurden *Northern-blot*-Analysen mit Gesamt-RNA aus WT-Pflanzen und homozygoten Mutanten durchgeführt (Abb. 13 A-D). Als Sonden wurden verschiedene plastiden- sowie kernkodierte Gene verwendet. Mit Ausnahme von *psaJ* (PSI) in *atpl3* und *psbA* (PSII) in *atpl2* sind alle untersuchten Genprodukte in den Mutanten nachweisbar, wenn auch nur auf sehr geringem Transkriptlevel. Entsprechend der mRNA-Konzentration im *steady state* können in *atpl1*, *atpl2* und *atpl3* drei Gengruppen unterschieden werden. In der ersten Gruppe sind die Gene zusammengefasst, deren mRNA-Akkumulation auf deutlich niedrigerem Level erfolgt (Abb. 13A). Dies betrifft *psaAB*, *psaC*, *psaJ* (PSII) sowie *psbA* (PSI), *rbcL* (kodiert für die große Untereinheit der Ribulose-1,5-Bisphosphat-Carboxylase) und *rps14* (kodiert für ein ribosomales Protein; Sato *et al.*, 1999). Interessanterweise enthalten Gene dieser Gruppe, wie z. B. das trizistronische Transkript *psaA/psaB/rps14* (Hajdukiewicz *et al.*, 1997), *psbA* (Liere *et al.*, 1995) und *rbcL* (Silhavy und Maliga, 1998), ausschließlich Promotorelemente, die von der plastidenkodierten RNA-Polymerase genutzt werden. Die zweite Gruppe umfasst Gene, deren Transkripte im WT und in den Mutanten auf ähnlichem Level akkumulieren (Abb. 13B). Dazu gehören *atpB* (kodiert für die  $\beta$ -Untereinheit der ATPase; Orozco *et al.*, 1990) und *clpP* (kodiert für die katalytische Untereinheit der ATP-abhängigen Protease; Maurizi *et al.*, 1990). Das mRNA-Level der dritten Gruppe ist in den Mutanten deutlich höher als im WT (Abb. 13C). Darunter befinden sich *accD* (kodiert für die Untereinheit der Acetyl-CoA-Carboxylase; Sasaki *et al.*, 1995), *atpA* ( $\alpha$ -Untereinheit der ATPase; Sato *et al.*, 1999) und die beiden Gene der Untereinheiten des NADH-Dehydrogenase-Komplexes *ndhF* und *ndhB* (Peltier und Cournac, 2002). Gene der beiden letztgenannten Gruppen weisen NEP-spezifische Promotorelemente auf. An Beispielen der Photosyntheseuntereinheiten *psaH*, *psaE* (PSI) und *psbO* (PSII) konnte gezeigt werden, dass Transkripte kernkodierter Gene in den Mutanten auf WT-Level akkumulieren (Abb. 13D).



**Abbildung 13:** Northern-blot-Analysen plastidärer und nukleärer Transkripte im WT, *atp11*, *atp12* und *atp13*. Es wurden 15 µg Gesamt-RNA aus Blättern von *atp11* (Spur 4), *atp12* (Spur 5), *atp13* (Spur 6) sowie 15 µg (Spur 3), 7.5 µg (Spur 2) und 3.25 µg (Spur 1) aus WT-Blättern gelelektrophoretisch in 1.2% igen Agarose-Formaldehydgelen aufgetrennt. Nach dem Transfer auf Nylonmembranen wurde mit Sonden für plastiden- (*atpA*, *atpB*, *clp*, *psaAB*, *psaC*, *psaJ*, *psbA*, *ndhB*, *ndhF*, *rbcL* und *rps14*) und kernkodierte Transkripte (*psaE*, *psaH* und *psbO*) hybridisiert. Die verwendeten Sonden sind jeweils rechts neben dem Filter angegeben. Unterhalb der Northern-blots ist jeweils die 25S rRNA des korrespondierenden Ethidiumbromid-gefärbten Gels abgebildet. Die Northern-blots sind entsprechend der mRNA-Konzentration in 3 Gruppen zusammengefasst: (A) Transkriptakkumulation erfolgt in WT-Pflanzen auf deutlich höherem Level als in den Mutanten, (B) mRNAs akkumulieren auf WT-Level, und (C) in den Mutanten werden Transkripte deutlich stärker akkumuliert. (D) Transkripte für kernkodierte Gene akkumulieren auf WT-Level. Die Pfeile markieren die Größen 3.2 kb, 5.3 kb, 6.3 kb und 7.1 kb.

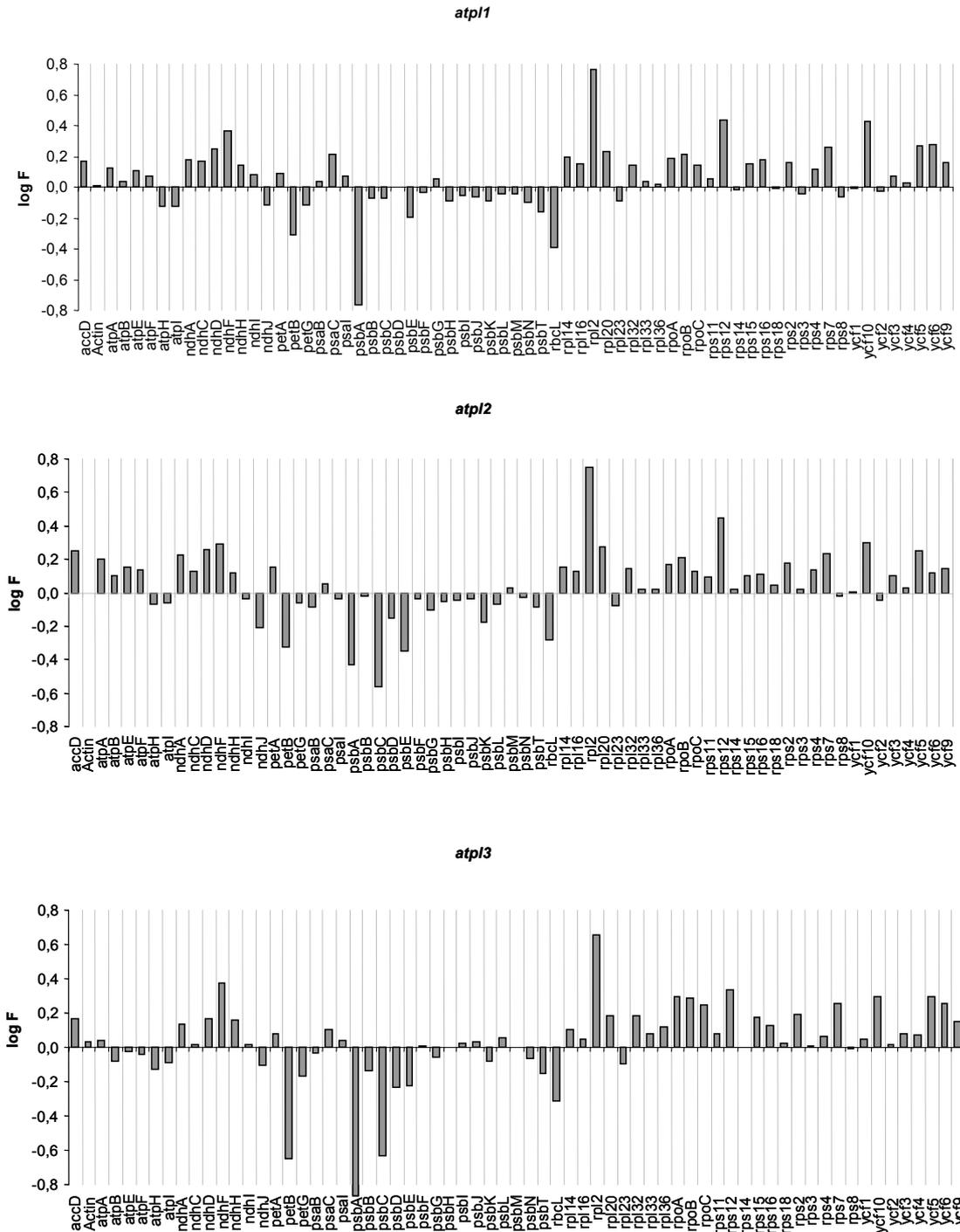
Ferner zeigen die Mutanten quantitative Unterschiede im Transkriptionsmuster. In *atpl1*, *atpl2* und *atpl3* konnten für *accD*, *atpB*, *clpP*, *ndhB*, *ndhF*, *psaAB*, *rbcL* und *rps14* höher molekulare Präkursormoleküle detektiert werden. Beispielsweise ist in den Mutanten das 5.3 kb große trizistronische Transkript *psaA/psaB/rps14* stark reduziert. Während das durch Prozessierung entstandene 3.2 kb große Produkt im WT und den Mutanten auf gleichem Level akkumuliert, können höher molekulare Transkripte der Längen 7.1 kb und 6.3 kb nur in den Mutanten detektiert werden. Diese durch Ko-Transkription mit *ycf3* (*hypothetical chloroplast open reading frame*; Hiratsuka *et al.*, 1989) entstandenen Produkte entsprechen in ihrer Länge der polyzistronischen Transkriptionseinheit *ycf3/psaA/psaB/rps14* (Summer *et al.*, 2000). Bei Anwendung der *rps14*-Sonde konnten die gleichen polyzistronischen Transkripte erhalten werden wie bei der Hybridisierung mit *psaAB* (Abb. 13A). Die verschiedenen Signalstärken einzelner Banden dieser Transkripte können durch die Nutzung unterschiedlicher Transkriptionsinitiationsstellen, veränderte Prozessierungseigenschaften der polyzistronischen Transkriptionseinheiten, eine verringerte RNA-Stabilität oder unterschiedliche Transkriptionsterminationssignale bedingt sein.

#### 2.4.2 Akkumulationsanalysen plastidärer Transkripte mittels *Macroarrays*

Die Untersuchung der Transkriptakkumulation des gesamten Plastidengenoms erfolgte mittels *Macroarray*-Analysen. Die Hybridisierungsreaktionen sowie die Datenanalysen wurden freundlicherweise von Dr. A. Kandlbinder (Universität Bielefeld, Lehrstuhl für Biochemie und Physiologie der Pflanzen) vorgenommen (Kandlbinder *et al.*, 2004).

In den untersuchten Mutanten *atpl1*, *atpl2* und *atpl3* sind deutliche Abweichungen in der Transkriptakkumulation im Vergleich zum WT feststellbar (Abb. 14). Übereinstimmend mit *Northern*-Daten zeigen insbesondere Transkripte der Gene der Photosysteme I und II sowie des Cytochrom-*b<sub>6</sub>/f*-Komplexes eine Akkumulationsreduktion. In *atpl1*, *atpl2* und *atpl3* sind die Signale von *petB* (Gen für die Untereinheit IV des Cytochrom-*b<sub>6</sub>/f*-Komplexes) und *rbcL* im Vergleich zum WT um mehr als 50% erniedrigt. Der mRNA-Spiegel von *psbA* entspricht in *atpl1* und *atpl3* nur 20% des WT-Levels. In *atpl2* liegen außerdem *psbC* und *psbE* (PSII) drastisch reduziert vor. Im Gegensatz zu *Northern-blot*-Analysen zeigen andere Gene, die für

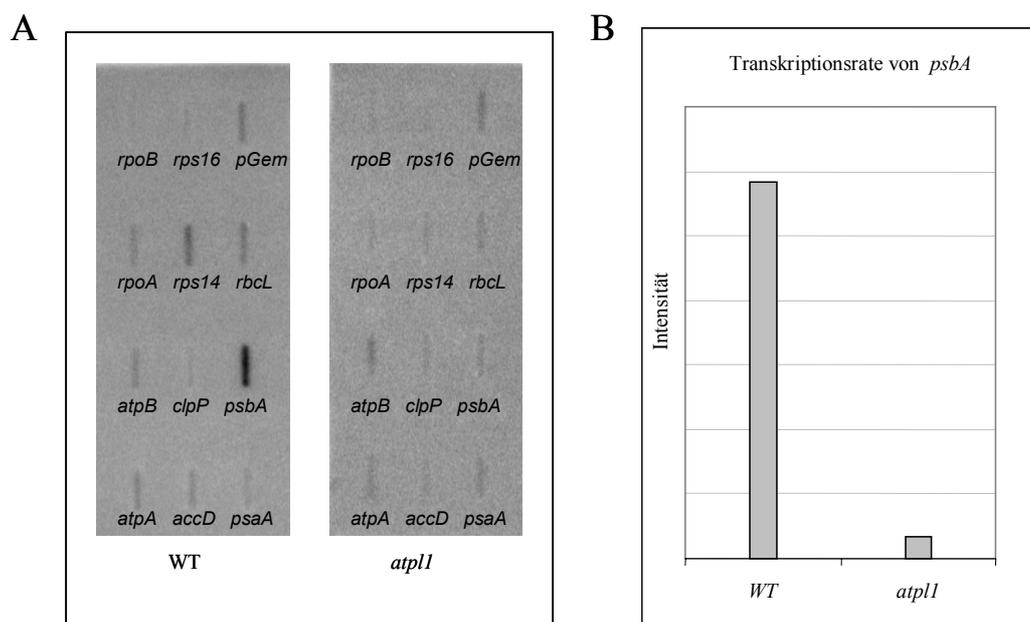
Untereinheiten des PSI (*atp11: psaB; atp12: psal; atp13: psaB und psal*) und PSII (*atp11: psbD, psbF, psbL und psbM; atp12: psbB, psbF, psbI, psbJ, psbM und psbN; atp13: psbF, psbH, psbI, psbJ und psbM*) kodieren, in den Mutanten ähnliche Akkumulationsverhältnisse zum WT. Korrespondierend zu *Northern-blots* wurden auch für *atpB* ähnliche mRNA-Spiegel detektiert. Dagegen akkumulieren Transkripte, wie *rps-*, *rpl-* (kodieren für ribosomale Proteine), *ndh-* (kodieren für Untereinheiten der NADH-Dehydrogenase), *atp-* (kodieren für Untereinheiten der ATPase), *rpo-* (kodieren für Untereinheiten der RNA-Polymerase) und *ycf* (*hypothetical chloroplast open reading frame*) auf deutlich höherem Niveau. Eine Transkriptakkumulationssteigerung um ca. 50% ist in *atp11* für *accD*, Gene der Untereinheiten der NADH-Dehydrogenase (*ndhA, ndhC, ndhD und ndhF*), Gene ribosomaler Untereinheiten (*rpl14, rpl2, rpl20, rps2, rps7, rps12, rps15 und rps16*), Gene der Untereinheiten der RNA-Polymerase (*rpoA und rpoB*) und Gene offener Leserahmen (*ycf5, ycf6, ycf9 und ycf10*) zu verzeichnen. Diese Expressionsmuster sind auch für *atp12* (*accD, atpA, ndhA, ndhD, ndhF, rpl2, rpl20, rps2, rps7, rps12, ycf5 und ycf10*) und *atp13* (*accD, ndhD, ndhF, ndhH, rpl2, rpl20, rpl32, rpoA, rpoB, rpoC1, rps2, rps7, rps12, rps15, ycf5, ycf6 und ycf10*) charakteristisch. Überraschenderweise wurde in *atp11* eine signifikante Tendenz zur gesteigerten Akkumulation von *psaC* (PSI) nachgewiesen, die im *Northern-blot* nur ca. 25% des WT-Signals erreicht. Ebenso widersprüchlich sind die Hybridisierungsdaten weiterer Photosynthesegene (*psaB, psaC und psal*). Die erhaltene Signalintensität könnte durch Hybridisierung mit markierter *antisense*-mRNA bedingt sein. Die Akkumulationsverhältnisse in den Mutanten sind in Abb. 14 graphisch dargestellt.



**Abbildung 14:** Expressionsmuster plastidärer Gene in *atp11*, *atp12* und *atp13* im Vergleich zum WT. *Macroarrays* wurden mit cDNA-Proben hybridisiert, die mittels RT-PCR aus Gesamt-RNA synthetisiert wurden. Der logarithmische Induktionsfaktor (log IF) wurde aus dem Verhältnis der einzelnen Signalintensitäten von Mutante zu WT berechnet. Sich daraus ergebende positive Werte kennzeichnen eine Akkumulationssteigerung und negative Werte eine Akkumulationsreduktion der mRNA im *steady state*.

## 2.5 Analysen der Transkriptionsraten plastidärer Gene mittels *run-on*-Transkription

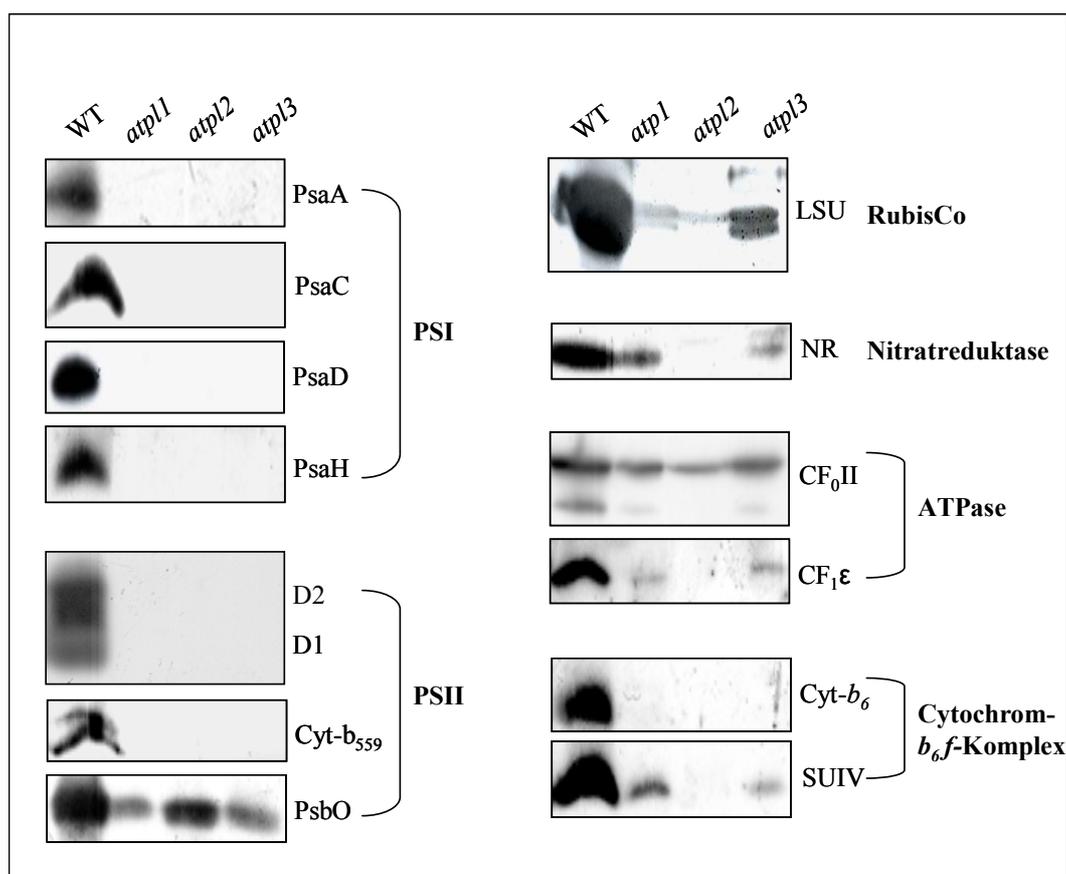
Die reduzierte Transkriptakkumulation für Untereinheiten membranintegrierter Photosynthesekomplexe kodierende Gene, könnte durch eine herabgesetzte Transkriptionsrate der betroffenen Gene bedingt sein. Um diese mögliche Ursache der Akkumulationsdefizienz zu überprüfen, wurden *run-on*-Transkriptionsanalysen vorgenommen. Zunächst wurden verschiedene plastidäre Genfragmente auf eine Nylonmembran fixiert (s. 2.6.4). Der Nachweis der Transkriptionsraten erfolgte schließlich durch Hybridisierung der Membranen mit  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-UTP-markierten *run-on*-Transkripten aus  $2 \times 10^7$  lysierten Chloroplasten, isoliert aus *atpl1*- und WT-Pflanzen. Es wurden jeweils drei Hybridisierungen mit Transkripten aus unabhängigen *run-on*-Markierungen durchgeführt. Aus vorliegenden Daten konnte nach Abzügen der Hintergrundsignale (Hybridisierungssignal der Kontroll-DNA) nur für *psbA* mit Sicherheit eine Reduktion der Transkriptionsraten in *atpl1* festgestellt werden (Abb. 15). Dies geht konform mit der *psbA*-Transkriptakkumulation, die sowohl in *Northern-bot*-Analysen als auch in *Array*-Experimenten stark reduziert ist. Somit könnte der Mangel der Transkriptakkumulation von *psbA* sowie weiterer plastidärer Gene in *atpl1* auf verminderte Transkriptionsraten zurückzuführen sein. Auf Grund niedriger Signalintensitäten, möglicherweise bedingt durch zu geringe Transkriptionsaktivitäten des verwendeten Materials, kann keine eindeutige Aussage zu Transkriptionsraten weiterer untersuchter Gene getroffen werden. Mit *atpl2* und *atpl3* konnten auf Grund mangelndem homozygotem Pflanzenmaterial keine *run-on*-Analysen durchgeführt werden.



**Abbildung 15:** *run-on*-Transkriptionsanalysen verschiedener Plastidengene von *atp11* und WT. Die Transkription erfolgte mit  $2 \times 10^7$  Chloroplasten, isoliert aus *atp11*- und WT-Pflanzen. Für den Nachweis der Transkripte wurden jeweils 4 pmol Plasmid-DNA auf eine Nylonmembran fixiert. Der Vektor pGem<sup>®</sup>-T wurde als Kontroll-DNA verwendet. **(A)** Hybridisierungssignale der *slot blots*. **(B)** Graphische Darstellung der Transkriptionsrate von *psbA*.

## 2.6 Immuno-*blot*-Analysen

Bisher konnte gezeigt werden, dass die T-DNA-Insertionen in den Genen *ptac2*, *ptac6* und *ptac12* in den entsprechenden *knock-out*-Pflanzen zu Änderungen der Transkriptionsraten, der Transkriptakkumulation und möglicherweise zu quantitativen Prozessierungsunterschieden führen. Mittels *Immuno-blot*-Studien mit Antiseren gegen Untereinheiten des PSI und PSII, des ATPase- sowie des Cytochrom-*b<sub>6</sub>/f*-Komplexes sollte überprüft werden, ob sich diese Expressionsunterschiede plastidärer Gene auf Proteinebene widerspiegeln. Erwartungsgemäß konnten in den Mutanten die plastidenkodierte Untereinheiten D1 (PsbA), D2 (PsbD), Cyt-*b<sub>559</sub>* (PsbF), PsaA und PsaC der Photosysteme I und II sowie Cyt-*b<sub>6</sub>* (PetB) des Cytochrom-*b<sub>6</sub>/f*-Komplexes nicht nachgewiesen werden (Abb. 16).



**Abbildung 16:** Immuno-blot-Analysen der Mutanten *atp11*, *atp12* und *atp13* im Vergleich zum WT. Es wurden jeweils 15 µg Membranproteine und lösliche Proteine in 12.5% Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt und auf PVDF-Membranen transferiert. Der immunologische Nachweis der Proteine erfolgte mit polyklonalen Antisera gegen die Untereinheiten PsaA, PsaC, PsaD, PsaH (PSI), D1, D2, Cyt-*b*<sub>559</sub>, PsbO (PSII), LSU (RubisCo), NR (Nitratreduktase), CF<sub>0</sub>II, CF<sub>1</sub>ε (ATPase-Komplex), Cyt-*b*<sub>6</sub> und Untereinheit IV des Cytochrom-*b*<sub>6</sub>/*f*-Komplexes (SUIV).

Im Gegensatz zum mRNA-Spiegel waren keine Expressionssignale der kernkodierten Untereinheiten PsaH (PSI) und PsaD (PSII) in den Mutanten feststellbar. Indessen wurden reduzierte Mengen der ebenfalls im Kern kodierten Untereinheit PsbO (< 50%) sowie der Untereinheit IV des Cytochrom-*b*<sub>6</sub>/*f*-Komplexes (PetD; < 10%) detektiert. In *atp12* erfolgt keine Akkumulation von PetD. Die Untereinheit CF<sub>0</sub>II (AtpB) liegt in *atp11* sowie *atp13* zu ca. 50% und in *atp12* zu 25% reduziert vor. Eine weitere Untereinheit des ATPase-Komplexes, CF<sub>1</sub>ε (AtpE), akkumuliert in *atp11* und in *atp13* zu 10%. In *atp12* wurde kein Signal erhalten. Bei den Proteinen LSU (RbcL) und NR (Nitratreduktase) ist ebenfalls eine Reduktion auf

---

weniger als 25% des WT-Spiegels zu beobachten. Aus vorliegenden Daten kann geschlossen werden, dass in den Mutanten keine funktionsfähigen Komplexe der photosynthetischen Elektronentransportkette gebildet werden. Offensichtlich sind weitere essentielle Prozesse, wie Nitrat- und Eisenmetabolismus (Daten nicht gezeigt) stark beeinträchtigt.

## IV. Diskussion

### 1 Massenspektrometrische Analyse des TAC-Komplexes aus *Arabidopsis*- und *Sinapis*-Chloroplasten

Plastiden verfügen über mindestens zwei verschiedene RNA-Polymerasen (Hess *et al.*, 1993; Lerbs-Mache, 1993; Hedtke *et al.*, 1997; 2000; Bligny *et al.*, 2000). Während die NEP hauptsächlich die Transkription von ‚housekeeping‘ Genen übernimmt, ist die plastidenkodierte PEP für die Transkription von Photosynthese- und Haushaltsgenen verantwortlich (Allison *et al.*, 1996; Hajdukiewicz *et al.*, 1997; Hess und Börner, 1999). Wie immunologische Studien zeigten, ist die PEP in einer löslichen Fraktion (sRNAP) und einer membranassoziierten Fraktion, dem TAC (*transcriptionally active chromosome*) zu finden (Suck *et al.*, 1996; Krause und Krupinska, 2000). Das TAC, ein hochmolekularer DNA/RNA-Proteinkomplex, ist zur Transkription von PEP- sowie NEP-abhängigen Genen befähigt (Igloi und Kössel, 1992; Krupinska und Falk, 1994). Demnach sollte auch die kernkodierte Polymerase NEP im TAC vorliegen. In SDS-Gelen aufgetrennte TAC-Fraktionen enthalten bis zu 40 verschiedene Proteine, deren Funktionen bislang noch unbekannt sind. Das Hauptanliegen dieser Arbeit bestand in der Identifizierung und Charakterisierung neuer TAC-Komponenten unter Verwendung eines proteom-genetischen Ansatzes.

#### 1.1 Identifizierung neuer TAC-Proteine

Bisher wurden TAC-Fraktionen aus Grünalgen (Rushlow und Hallick, 1982; Narita *et al.*, 1985) und höheren Pflanzen (Briat und Mache, 1980; Reiss und Link, 1985; Krupinska und Falk, 1994) durch Gelfiltrationsmethoden nach Hallick *et al.* (1976) isoliert. Immunologische Untersuchungen der Proteinkomposition angereicherter TAC-Fraktionen führten zum Nachweis der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit der PEP (Suck *et al.*, 1996; Krause und Krupinska, 2000) sowie eines kürzlich beschriebenen Proteins mit Homologie zum nukleären Transkriptionselongationsfaktor TFIIS (da Costa e Silva *et al.*, 2004). In der vorliegenden Arbeit konnte das TAC sowohl aus *Arabidopsis thaliana* als auch aus *Sinapis alba* durch Gelfiltration angereichert werden. Darüber hinaus erfolgte eine erfolgreiche Isolation von DNA/RNA-bindenden TAC-Proteinen durch Heparin-Sepharose-Chromatographie. Schließlich wurde erstmalig die TAC-Proteinkomposition massenspektrometrisch analysiert. Dabei war das Anliegen, die Komponenten des TAC-Komplexes als funktionelle Einheit zu

erfassen. Mittels Massenspektrometrie konnten insgesamt 26 Proteine im TAC aus *Arabidopsis thaliana* und *Sinapis alba* eindeutig identifiziert werden. Diese sind auf Grund ihrer Funktionen und Homologie zu bekannten Proteinen bzw. ihrer Proteinstruktur folgenden Funktionsklassen zuzuordnen: Replikation, Transkription, Translation, Detoxifikation, Proteinmodifikation und Metabolismus. Entsprechend ihren Eigenschaften handelt es sich bei sechs der identifizierten Proteine um nukleinsäurenbindende Proteine (die  $\beta$ ' Untereinheiten der PEP, eine putative DNA-Polymerase A, zwei putative Untereinheiten der DNA-Gyrase, der Elongationsfaktor EF-Tu und das ribosomale Protein L12-A). Wie computerbasierende Analysen mit InterPro Scan (Apweiler *et al.*, 2000), PROSITE (Falquet *et al.*, 2002) und Pfam (Sonnhammer *et al.*, 1997; Bateman *et al.*, 2000) zeigten, weisen drei weitere Proteine bekannte DNA/RNA-Bindedomänen, wie das PPR- (PTAC2), das SMR- (PTAC2), das SAP- (PTAC3) bzw. das S1-Motiv (PTAC10) auf (Tab. 11). Darüber hinaus besitzen die Proteine PTAC1 und PTAC11 hohe Sequenzübereinstimmungen zu bereits charakterisierten DNA-bindenden p24-Proteinen, die als essentielle Faktoren der nukleären Transkription beschrieben wurden (Desveaux *et al.*, 2002). Möglicherweise sind PTAC1 und PTAC11 ebenfalls in der Lage Nukleinsäuren zu binden. Im Gegensatz zu Lokalisationsstudien bislang charakterisierter p24-Proteine, konnten die Proteine PTAC1 und PTAC11 in unabhängigen Experimenten in den Chloroplasten lokalisiert werden (persönliche Mitteilung von Dr. K. Krause). Unterstützt wird dieses Ergebnis dadurch, dass entsprechenden Vorhersageprogrammen zufolge, beide Proteine ein plastidendirektives Transitpeptid aufweisen (Tab. 11). Alle im TAC identifizierten kernkodierten Proteine besitzen nach bioinformatischen Berechnungen Transitsequenzen für eine plastidäre Lokalisation.

Die genaue Funktion der PTAC-Proteine muss in weiteren Studien noch untersucht werden. Sie könnten wichtige Faktoren der Replikation, Transkriptionsinitiation, -elongation bzw. -termination, RNA-Prozessierung oder RNA-Stabilisierung sein. Zudem könnten sie eine Nahtstelle zwischen der Transkription und RNA-Prozessierung bilden, wie anhand des *nusA*-Genes in *E. coli* gezeigt wurde (Liu und Hanna, 1995). Gegebenenfalls könnten sie auch eine wesentliche Rolle bei der plastidären Chromosomenorganisation spielen.

Von den im TAC identifizierten Proteinen sind dem Replikationssystem die DNA-abhängige putative DNA-Polymerase (Braithwaite und Ito, 1993; Kimura *et al.*, 2002) und die beiden putativen Untereinheiten der Topoisomerase II, Gyrase A und B zuzuordnen (Reece und Maxwell, 1991; Wigley *et al.*, 1991; Qi *et al.*, 2002).

Von der Transkriptionsmaschinerie konnten die vier plastidenkodierte Untereinheiten  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\beta'$  und  $\beta''$  der PEP nachgewiesen werden. Andere Untereinheiten des TAC-Komplexes könnten Proteinkinasen, Eisen-Superoxid-Dismutasen und Fruktokinasen sein, da diese bereits im PEP-A-Komplex einer löslichen Chloroplastenfraktion aus *Sinapis alba* gefunden wurden (Ogrzewalla, Dissertation 2001; Ogrzewalla *et al.*, 2002; Loschelder *et al.*, 2004). Wie die massenspektrometrischen Analysen dieser Arbeit zeigen, liegen im TAC-Komplex zwei Eisen-Superoxid-Dismutasen (Fe-SOD) und zwei fruktokinaseähnliche Proteine vor. Dabei entspricht die Eisen-Superoxid-Dismutase 3 (FSD3; At5g23310) und die Fruktokinase 2 (At3g54090) den im PEP-A-Komplex aus Senf identifizierten Proteinen. Die Funktion dieser Untereinheiten am plastidären Transkriptionssystem konnte bisher nicht geklärt werden.

SODs dismutieren Superoxidradikale zu Wasserstoffperoxid und Sauerstoff (Fridovich, 1978; Bowler *et al.*, 1992). In Chloroplasten entstehen Superoxide als unerwünschte Nebenprodukte der Photosynthese (Barber und Andersson, 1992). Superoxide sind toxische reaktive Sauerstoffzwischenprodukte, die zum oxidativen Zellstress führen (Bannister *et al.*, 1987; Price und Hendry, 1991). Schließlich können Superoxide sowie deren Derivate Wasserstoffperoxide und Hydroxylradikale durch Interaktionen mit Aminosäuren zu Proteininaktivierungen bzw. bei Interaktionen mit Nukleinsäuren zu Modifikationen von Basen sowie Strang- und Chromosomenbrüchen führen (Cadenas, 1989; Michaels und Miller, 1992). Als notwendige Schutzmechanismen des Transkriptionsapparates vor reaktiven Sauerstoffspezies wäre, wie bereits diskutiert (Pfannschmidt *et al.*, 2000), die Beteiligung von Fe-SODs an transkriptionellen Detoxifikationsprozessen denkbar. Dass Wasserstoffperoxide einen Einfluss auf die Transkription haben, konnte am Beispiel der plastidenkodierte NDH-Gene von *Hordeum vulgare* L. gezeigt werden. Diese werden in einer  $H_2O_2$ -vermittelten Reaktion unter photooxidativen Stress hoch reguliert (Casano *et al.*, 2001). Aus diesem Grund könnten Dismutasen als Glieder einer Signalkaskade der Genexpression die Antwort auf oxidativen Zellstress darstellen.

Einige der identifizierten Proteine, wie die fruktokinaseähnlichen Proteine, sind an spezifischen metabolischen Prozessen beteiligt und scheinen somit keinen direkten Einfluss auf Transkriptionsprozesse auszuüben. Fruktokinasen katalysieren die Phosphorylierung von Fruktose zu Fruktose-6-Phosphat. Im Hinblick auf die zuckerregulierte Genexpression einiger Photosynthesegene (Pego und Smeekens, 2000; Oswald *et al.*, 2001) könnten Fruktokinasen

wichtige Bindeglieder einer Signaltransduktionskette sein und dabei die Transkription indirekt regulieren.

Das Auffinden eines putativen Thioredoxins im TAC lässt ebenfalls auf eine nahe räumliche Zusammenarbeit der Photosynthese mit der Transkriptionsmaschinerie schließen. Das Thioredoxin-System überträgt Elektronen aus der Photosynthese auf Schlüsselenzyme des Chloroplastenstoffwechsels. Dabei werden die Zielenzyme über eine Redoxmodifikation in ihrer Aktivität reguliert (Schürmann und Jacquot, 2000). In *Rhodobacter sphaeroides* konnte am Beispiel des *puf*-Operons gezeigt werden, dass Thioredoxin eine regulatorische Funktion auf Transkriptionsebene ausübt (Pasternak *et al.*, 1999). Im TAC nimmt das putative Thioredoxin möglicherweise ebenfalls Einfluss auf die plastidäre Transkription, indem es regulatorische Proteine der plastidären Genexpression in ihrer Aktivität modifizieren.

Die lokale Nähe von Transkriptions- und Translationsprozessen in den Plastiden legt eine enge zeitliche Zusammenarbeit beider Prozesse nahe. Deshalb ist es nicht erstaunlich, im TAC-Komplex Komponenten des Translationsystems, wie z. B. das ribosomale Protein L12-A oder den Elongationsfaktor Tu, vorzufinden.

Die Untersuchung der Proteinzusammensetzung des TAC erfolgte auf zwei unterschiedlichen Wegen. Zum einen wurden die TAC-Proteine direkt nach ihrer Anreicherung im ESI-IONTRAP vermessen. Andererseits wurden die TAC-Fractionen in SDS-Gelen nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt und anschließend massenspektrometrisch analysiert. Dabei konnten dreizehn Proteine identifiziert werden (Tab. 10), die bereits im ersten Ansatz gefunden wurden. Die in den Bereichen von 19 - 23, 36 - 38 und 49 - 51 kDa identifizierten Histone und ATPase-Untereinheiten sind als Kontaminationen zu betrachten. Für die in dieser Arbeit angewandten Methoden zur Anreicherung des TAC spricht, dass außer diesen Proteinen keine weiteren gefärbt und massenspektrometrisch bestimmt werden konnten, die auf Grund ihrer Funktionen auf Verunreinigungen zurückzuführen sind. Deshalb ist anzunehmen, dass es sich bei den nach Silberfärbung sichtbaren Proteinen um abundante TAC-Komponenten handelt.

Dagegen wurden bei Messungen der gesamten Proteinkomposition mehrere Kontaminationen detektiert (z. B. photosynthetische Membranproteine, Stoffwechsellzyme, kernlokalisierte Histone und histonähnliche Proteine). Die Verunreinigung mit Photosyntheseproteinen ist darauf zurückzuführen, dass der TAC-Komplex mit dem plastidären Membransystem assoziiert ist. Eine mögliche Erklärung für das Auffinden von kernlokalisierten Histonen im

TAC ist ihre Basizität, die es ihnen ermöglichen könnte, frei zugängliche Nukleinsäuren zu binden. So könnten die im Saccharosegradienten fraktionierten Chloroplasten partiell mit Zellkernen kontaminiert sein. Beim Aufschluss der Chloroplastenfraction hätten diese Kernproteine die Möglichkeit plastidäre DNA zu binden. Nach chromatographischen Reinigungsschritten wären ebenfalls die Histonproteine in der TAC-Fraktion wieder zu finden. Obwohl histonähnliche Proteine schon im Plastom pro- und eukaryotischer Organismen beschrieben wurden (Wang und Liu, 1991; Kobayashi *et al.*, 2002), sind die in den TAC-Fractionen von *Arabidopsis thaliana* und *Sinapis alba* identifizierten histonähnliche Proteine, auf Grund der hohen Sequenzhomologie zu Kernhistonen, nicht als plastidäre nukleoidenorganisierende Strukturen zu interpretieren. Auch in den Mitochondrien wurden bereits histonähnliche Proteine charakterisiert (Certa *et al.*, 1984; Drlica und Rouviere-Yaniv, 1987; Avliyakov *et al.*, 2004). Daher wären histonähnliche Proteine auch im TAC zu erwarten. Durch biochemische Ansätze, z. B. mit geeigneten Ionenaustauschsäulen, sollte eine Anreicherung dieser möglich sein.

## 1.2 RNA-Polymerasen und Transkriptionsfaktoren im TAC

Wie Arbeiten mit ribosomendefizienten Plastiden aus Gerste vermuten lassen, existiert wahrscheinlich im TAC neben der plastidenkodierte RNA-Polymerase PEP eine nukleärkodierte RNA-Polymerase, die NEP (Falk *et al.*, 1993). Jedoch konnte diese bislang noch nicht immunologisch nachgewiesen werden (Suck *et al.*, 1996). Aus massenspektrometrischen Untersuchungen von TAC-Fractionen, die erstmalig in der hier vorliegenden Arbeit erfolgten, konnte die Zugehörigkeit der NEP zum TAC-Komplex ebenfalls nicht bestätigt werden. Die Ursache dafür könnte allerdings auch in der generell geringen Expression der NEP zu suchen sein (Hess und Börner, 1999). Andererseits könnte das Protein während der Isolation degradiert oder unter den angewandten Bedingungen nicht in der TAC-Fraktion eluieren. Damit ließe sich auch erklären, weshalb keine transkriptionsregulatorischen Proteine, wie z. B. Sigmafaktoren, identifiziert werden konnten. Eine andere Erklärung wäre, dass, auf Grund stöchiometrischer Verhältnisse der Komponenten, weniger abundante Proteine durch die massenspektrometrische Methoden im gewählten Ansatz nicht erfasst wurden. Auch die Analyse der TAC-Proteine nach eindimensionaler Gelelektrophorese erbrachte (mit Ausnahme von At2g05430) keine

weiteren Proteine. Eine zweidimensionale gelelektrophoretische Auftrennung isolierter TAC-Fraktionen wurde durchgeführt. Jedoch konnten dabei keine Proteine mit entsprechendem Molekulargewicht und isoelektrischem Punkt durch Silbernitrat angefärbt werden, was ebenfalls auf eine sehr geringe Abundanz dieser Proteine schließen lässt (Daten nicht gezeigt).

### 1.3 Proteinkomposition der plastidären RNA-Polymerase im TAC-Komplex

Aus der löslichen Chloroplastenfraktion von Senf konnten zwei strukturell und biochemisch unterschiedliche RNA-Polymerasen, PEP-A und PEP-B, isoliert werden. Bei der PEP-A handelt es sich um einen chloroplastidären, rifampicinresistenten Multiproteinkomplex bestehend aus 13-15 Untereinheiten. Dagegen setzt sich das rifampicinsensitive PEP-B-Enzym aus vier Untereinheiten zusammen und ist vorwiegend in den Etioplasten aktiv. PEP-B unterliegt einer entwicklungsabhängigen Konvertierung durch Rekrutierung zusätzlicher Proteine zu PEP-A (Pfannschmidt und Link, 1994; 1997). Frühere massenspektrometrische Untersuchungen der PEP-A führten zur Identifizierung des *core*-Enzyms, einer Fe-Dismutase, einer Fruktokinase, der cpCK2 $\alpha$ -Untereinheit der Transkriptionskinase CK2, des putativen RNA-Bindeproteins g5bf und eines annexinähnlichen Proteins (Pfannschmidt *et al.*, 2000; Ogrzewalla, Dissertation 2001; Ogrzewalla *et al.*, 2002; Loschelder *et al.*, 2004). Neben den vier Untereinheiten der plastideneigenen RNA-Polymerase wurden im TAC die gleiche Fe-Dismutase und Fruktokinase identifiziert. Indessen konnten das putative RNA-Bindeprotein g5bf sowie das annexinähnliche Protein, deren Funktionen bislang ungeklärt sind, im TAC nicht detektiert werden. Ebenfalls nicht nachweisbar waren die plastidäre Transkriptionskinase bzw. die cpCK2 $\alpha$ -Untereinheit. Bei dieser Kinase handelt es sich um einen Proteinkomplex, der aus mindestens drei Untereinheiten besteht und entweder als freier Kinasekomplex oder assoziiert mit PEP-A vorliegt. Als Kinase-Polymerase-Komplex übernimmt die Proteinkinase eine zentrale Funktion bei der vom Phosphorylierungsstatus kontrollierten und redoxvermittelten Genexpression (Baginsky *et al.*, 1997; 1999). Dass keine Untereinheiten der Transkriptionskinase nachweisbar waren, könnte, neben den oben diskutierten Möglichkeiten, ein weiterer Hinweis darauf sein, dass das TAC in seiner Zusammensetzung als dynamischer DNA/RNA-Protein-Komplex in Anpassung an das Entwicklungsstadium der Pflanze und der sich ändernden Umwelt vorliegt. Dennoch ist es wahrscheinlich, dass sich die im TAC identifizierte plastidenkodierte RNA-Polymerase ähnlich wie das multimeren PEP-A Enzym der löslichen Fraktion zusammensetzt.

#### 1.4 Unterschiede der TAC-Präparationen von *Arabidopsis thaliana* und *Sinapis alba*

Die Voraussetzung für die Identifizierung von Proteinen durch Massenspektrometrie ist die Verfügbarkeit vollständiger Genomsequenzen. Aus diesem Grund wurde mit den Pflanzen *Arabidopsis thaliana* und *Sinapis alba* gearbeitet. Durch den bestehenden phylogenetischen Verwandtschaftsgrad (Durbin *et al.*, 1995) konnten die meisten Senfproteine durch Vergleich der gemessenen Peptidmassen mit den theoretischer Massen einer *Arabidopsis*-Datenbank ([ftp://ftp.arabidopsis.org/Sequences/blast\\_datasets/](ftp://ftp.arabidopsis.org/Sequences/blast_datasets/)) nachgewiesen werden. Aus Analysen der aufgenommen MS-Spektren geht hervor, dass achtzehn der identifizierten Proteine sowohl in TAC-Fractionen aus *Arabidopsis thaliana* als auch in TAC-Fractionen aus *Sinapis alba* vertreten sind. Eine Ausnahme bilden die putative DNA-Polymerase A (At3g20540), die putative Superoxiddismutase (At5g23310), die Fruktokinase (At1g69200), PTAC12 (At2g34640), PTAC6 (At1g21600) und PTAC8 (At2g46820). Während die letztgenannten Proteine in *Arabidopsis* detektiert wurden, waren das ribosomale Protein L12-A (At3g27830) und PTAC4 (At1g65260) lediglich im TAC aus Senf nachweisbar. Vermutlich sind geringfügige Sequenzabweichungen der untersuchten Organismen verantwortlich dafür, dass einige TAC-Proteine aus *Sinapis alba* nicht identifiziert werden konnten. Eine andere Erklärung der verschiedenen Proteinkomposition des TAC-Komplexes beider Organismen wäre das unterschiedliche Entwicklungsstadium des Ausgangsmaterials. Dabei kann sich eine abweichende entwicklungsbedingte Proteinkomposition ergeben. Schließlich könnte eine Änderung stöchiometrischer Verhältnisse von Untereinheiten darin resultieren, dass einzelne Komponenten des Komplexes mit den erfolgten massenspektrometrischen Analysen nicht mehr nachweisbar sind.

## 2 Identifizierung und Charakterisierung der Mutanten

Die separate Kompartimentierung genetischer Informationen für plastidäre Proteine erfordert einen koordinierten Regulationsmechanismus der Genexpression in Anpassung an umwelt- und entwicklungsbedingte Erfordernisse. In den letzten Jahren erfolgte in *Chlamydomonas reinhardtii* (Nickelsen *et al.*, 1994; Zerges und Rochaix, 1994; Rott *et al.*, 1998; Vaistij *et al.*, 2000) und höheren Pflanzen (Barkan *et al.*, 1994; Dinkins *et al.*, 1997; Fisk *et al.* 1999; Monde *et al.*, 2000; Bisanz *et al.*, 2003) die Charakterisierung vieler nukleärer Faktoren, die auf die Expression einzelner plastidärer Gene Einfluss nehmen. Mutationen dieser Gene

wirken sich oft auf posttranskriptionelle Prozesse aus (Barkan und Goldschmidt-Clermont, 2000). Eine zentrale Rolle bei der differentiellen Transkriptionsregulation der Chloroplasten spielen gewebe- und entwicklungsspezifische Transkriptionsfaktoren (Allison, 2000). In vorliegender Arbeit wurden durch die Sichtung einer *knock-out*-Mutantenpopulation mit T-DNA-Insertionen in Genen, korrespondierend zu denen im TAC identifizierten Proteinen, drei Linien von *Arabidopsis thaliana*, *atpl1*, *atpl2* und *atpl3*, identifiziert. Analysen der Mutanten zeigen einen globalen Effekt der Transkriptakkumulation und Prozessierung plastidärer Gene. Darüber hinaus ist in *atpl1* eine Reduktion der Transkriptionsraten zu beobachten.

Die Expression plastidärer Gene ist essentiell für die Differenzierung der Chloroplasten aus Proplastiden (Baumgartner *et al.*, 1993). So führen Defekte der plastidären Genexpression häufig zu einer geringeren Chlorophyllakkumulation (Hess, *et al.*, 1993; Allison *et al.*, 1996; Chatterjee *et al.*, 1996; De Santis-MacIossek *et al.*, 1999; Bligny *et al.*, 2000; Privat *et al.*, 2003; Bisanz *et al.*, 2003; da Costa e Silva *et al.*, 2004). Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Chloroplasten der Mutanten weisen eine gestörte Entwicklung photosynthetischer Membranstrukturen auf, was auf eine eingeschränkte Photosyntheseleistung schließen lässt. Dies steht im Einklang mit der beobachteten Chlorophylldefizienz. Dem entsprechend besitzen die Mutanten *atpl1* und *atpl3* einen bleichgrünen und *atpl2* einen bleichen Phänotyp. Überdies sind die Chloroplasten der Mutanten *atpl2* und *atpl3* etwas kleiner. Solche Entwicklungen wurden bereits bei Mutanten mit Defekten in der plastidären Genexpression beobachtet. Beispielsweise zeigen elektronenmikroskopische Untersuchungen der Chloroplasten von *abc1*-Mutanten in ihrer frühen Entwicklungsphase, neben Abweichungen in der Membranstrukturausbildung, einen durch Inaktivierung von *sigB* hervorgerufen Größenunterschied zum WT (Shirano *et al.*, 2003).

Aus Segregationsanalysen kann geschlossen werden, dass in den untersuchten Linien der korrespondierende Phänotyp jeweils an die T-DNA-Insertion gekoppelt ist. Die T-DNA-Insertion konnte für *ptac2* im 3. Exon, *ptac6* im 1. Intron und *ptac12* im 8. Intron nachgewiesen werden. Wie aus Expressionsanalysen dieser Gene hervorgeht, verhindern die Insertionen die Akkumulation der jeweiligen mRNAs, so dass keine Transkripte in den Mutanten zu detektieren sind.

Untersuchungen gewebespezifischer Transkriptakkumulation deuten auf eine konstitutive Expression der Gene *ptac2* und *ptac6*. Dagegen unterliegt *ptac12* einer gewebe- und entwicklungsspezifischen Expression. Dem Expressionsmuster von *ptac2* und *ptac6* kann entnommen werden, dass es sich um generelle Faktoren der plastidären Genexpression handelt. Regulatorische Faktoren, wie Transkriptionsfaktoren, werden in Anpassung an gegebene Erfordernisse differentiell exprimiert (Tan und Troxler, 1999; Allison; 2000; Fujiwara *et al.*, 2000; Morikawa *et al.*, 2002). Demnach könnte PTAC12 an wichtigen regulatorischen Prozessen während der frühen Genexpression teilhaben. Jedoch sind ihre Funktionen als konstitutive oder regulatorische Faktoren durch weitere molekularbiologische sowie biochemische Untersuchungen zu verifizieren.

Transkriptakkumulationsstudien zu Folge sind *ptac2*, *ptac6* und *ptac12* wichtige Faktoren der plastidären Genexpression. *Northern-blot*-Analysen zeigen quantitative und qualitative Unterschiede in der Transkriptakkumulation plastidärer Gene. Ähnliche Expressionsverhältnisse sind in  $\Delta rpo$ -Tabakpflanzen zu beobachten, bei denen durch die Deletion der *rpo*-Gene keine Synthese der korrespondierenden Proteine erfolgen kann (Allison *et al.*, 1996; Serino und Maliga, 1998; De Santis-MacIossek *et al.*, 1999). Entsprechend werden in *atpl1*, *atpl2* und *atpl3* grundsätzlich alle plastidenkodierten Gene transkribiert. Dabei können drei Genklassen unterschieden werden. Die größten Differenzen sind in Gruppe I vorhanden, mit Genen deren Transkripte weniger als 10% im Vergleich zum WT akkumulieren. Interessanterweise umfasst diese Gruppe PEP-abhängige Gene. So haben insbesondere die Gene der beiden Photosysteme, des Cytochrom-*b<sub>6</sub>/f*-Komplexes und der großen Untereinheit der Ribulose-1,5-Bisphosphat-Carboxylase eine Akkumulationsreduktion erfahren. Dagegen sind Gene mit NEP-spezifischen Promoterelementen in den Gruppen II und III vertreten (Abb. 13 unter 2.4.1). Die Transkriptanreicherung von Genen dieser Gruppen erfolgt entweder wie im WT (Gruppe II) oder verstärkt (Gruppe III).

Durch die *array*-Analysen werden die *Northern-blot*-Daten weitestgehend gestützt. Dabei konnte insbesondere für *psbA*, *rbcL* und *petB* eine drastische Akkumulationsreduktion verzeichnet werden. Widersprüche liegen teilweise bei den Hybridisierungssignalen einzelner Photosynthesetranskripte vor. Den *arrays* zu Folge scheinen in *atpl1*, *atpl2* und *atpl3* die mRNAs von *psaB*, *psaC* und *psaI* im Vergleich zum WT unbeeinflusst oder auf höherem Level zu akkumulieren (Abb. 14 unter 2.4.2). Diese Signalintensitäten könnten durch die Hybridisierung mit markierter *antisense*-mRNA bedingt sein.

Diese Befunde legen die Annahme nahe, dass in den Mutanten ein Defekt der durch die plastidenkodierte RNA-Polymerase vermittelten Transkription plastidärer Gene vorliegt. Ob in den Mutanten tatsächlich nur die kernkodierte RNA-Polymerase (NEP) aktiv sind, kann erst durch weiterführende Experimente geklärt werden. Eine gute Möglichkeit hierfür bieten *in vivo*-Promotor-"Mapping"-Studien.

Auffallend für die untersuchten Mutanten ist die mRNA-Akkumulation längerer Transkripte. Diese steht in Einklang mit dem Expressionsmuster von  $\Delta rpo$ -Pflanzen. Auch in ribosomendefizienten Pflanzen ist eine Anreicherung längerer Transkripte zu beobachten (Hess *et al.*, 1993; Zubko und Day, 2002). Die Unterschiede der Transkriptlängen könnten durch Änderungen der Initiations- oder Terminationsstellen, der Stabilität oder Prozessierung von PEP- oder NEP-synthetisierten Transkripten bedingt sein. Demnach könnten *ptac2*, *ptac6* und *ptac12* wichtige Faktoren posttranskriptioneller Prozesse sein.

PTAC2, PTAC6 und PTAC12 weisen keine Homologien zu Proteinen mit bekannter Funktion auf. Lediglich die PPR- bzw. TPR-Motive von PTAC2 zeigen Ähnlichkeiten zu bereits charakterisierten, an RNA-Prozessierungs- oder RNA-Stabilisierungsprozessen beteiligten Faktoren. Jedoch sind diese Proteine für die Prozessierung/Stabilisierung spezifischer mRNAs oder polyzistronischer Transkriptionseinheiten verantwortlich (Fisk *et al.*, 1999; Boudreau *et al.*, 2000; Vaistij *et al.*, 2000; Hashimoto *et al.*, 2003; Yamazaki *et al.* 2004). Dagegen scheint in *atpl1* wie auch in *atpl2* und *atpl3* kein spezifischer Prozessierungs- bzw. Stabilisierungsdefekt vorzuliegen, sondern ein pleiotropher, die plastidäre Genexpression umfassender Effekt.

Im Fall von *atpl1* konnte eine reduzierte Transkriptionsrate des *psbA*-Genes nachgewiesen werden, das auch in  $\Delta rpoB$ -Tabakpflanzen verringert transkribiert wird (Krause *et al.*, 2000). Dies deutet ebenfalls darauf hin, dass in *atpl1* eine ineffiziente Transkription PEP-abhängiger Gene vorliegt. Ob in *atpl1* weitere Gene in ihren Transkriptionsraten betroffen sind, kann an Hand der gegenwärtig durchgeführten Experimenten nicht beurteilt werden. Für *atpl2* und *atpl3* waren auf Grund mangelnder Biomasse keine Untersuchungen der Transkriptionsraten möglich.

In *etl-R*-Mutanten wurde eine signifikante Reduktion der relativen Transkriptionsaktivität des TAC-Komplexes nachgewiesen, während die Genspezifität des Transkriptionsapparates

unbeeinflusst bleibt (da Costa e Silva *et al.*, 2004). Der Nachweis des korrespondierenden ET1-Proteins als TAC-Komponente erfolgte immunologisch. Struktur- und Sequenzanalysen zu Folge zeigt dieses Protein deutliche Ähnlichkeit zum nukleären Elongationsfaktor TFIIS. Inwieweit die Transkriptionsaktivität des TAC in *atpl1*, *atpl2* und *atpl3* von den jeweiligen Mutationen beeinträchtigt ist, konnte, ebenfalls auf Grund der geringen Ausbeute an homozygotem Pflanzenmaterials, nicht untersucht werden.

Obwohl mRNAs plastiden- und kernkodierter photosynthetischer Membranproteine detektiert wurden, konnten in *atpl1*, *atpl2* und *atpl3* keine Photosyntheseproteine sowie Untereinheiten des Cytochrom-*b<sub>6</sub>/f*-Komplexes (PsbA, PsbD, PsbF, PsaA, PsbC und PetB) nachgewiesen werden. Eine Ausnahme bildet PsbO. Aus den Beispielen von AtpB, AtpE, PetD und RbcL kann geschlussfolgert werden, dass in den Plastiden der untersuchten Mutanten grundsätzlich eine Translation erfolgt, wobei die Proteinmenge auch in diesen Fällen weit unter dem WT-Spiegel liegt. Dies kann durch eine verminderte Translation unprozessierter Transkripte (Barkan *et al.*, 1994; Rott *et al.*, 1998) und/oder einen epistatischen Effekt (Wollmann *et al.*, 1995; Legen *et al.*, 2002) hervorgerufen sein.

Die vorliegenden Daten deuten darauf hin, dass PTAC2, PTAC6 und PTAC12 essentielle regulatorische Faktoren der plastidären Genexpression sind. Da weder in cyanobakteriellen noch in anderen prokaryotischen Organismen sequenzähnliche Proteine gefunden wurden, könnte es sich um evolutionär neuerworbene Proteine handeln. Um den vorliegenden Defekt der Genexpression in *atpl1*, *atpl2* und *atpl3* weiter aufzuklären, wären zunächst Protein-Protein-Interaktionsstudien für eine Funktionsanalyse derselben hilfreich.

## V. Zusammenfassung

Die Transkription plastidärer Gene wird von zwei verschiedenen DNA-abhängigen RNA-Polymerasen übernommen: einer plastidenkodierten (PEP, *plastid encoded polymerase*) und einer kernkodierten RNA-Polymerase (NEP, *nuclear encoded polymerase*), die sich sowohl strukturell als auch funktionell unterscheiden (Hess und Börner, 1999). Die plastidenkodierte RNA-Polymerase konnte nach biochemischer Fraktionierung von Chloroplastenproteinen in zwei unterschiedlichen Fraktionen, dem TAC (*transcriptionally active chromosome*), einem hochmolekularen DNA/RNA-Protein-Komplex, sowie der sRNAP (*soluble RNA polymerase*), immunologisch nachgewiesen werden (Suck *et al.*, 1996; Krause und Krupinska, 2000). Ziel der hier vorgelegten Arbeit war die Identifizierung von neuen Faktoren, die an der plastidären Genexpression beteiligt sind. Hierfür bietet sich die massenspektrometrische Analyse des transkriptionsaktiven DNA/RNA-Protein-Komplexes (TAC) an. Darüber hinaus sollten durch Untersuchungen von *knock-out* Mutanten essentielle Komponenten des TAC charakterisiert werden, die an transkriptionellen oder posttranskriptionellen Prozessen beteiligt sind. Dies erfolgte über die Sichtung einer Mutantenpopulation, bestehend aus Linien mit T-DNA-Insertionen in Genen, die für die im TAC identifizierten Proteine kodieren.

Mittels ESI-IONTRAP (*electrospray ionization – ion trap*) konnten insgesamt 26 Proteine in durch Gelfiltrationschromatographie angereicherten TAC-Fractionen aus *Arabidopsis thaliana* und *Sinapis alba* identifiziert werden. Davon sind 14 Proteine, einschließlich der vier Untereinheiten des *core*-Enzyms der plastidären RNA-Polymerase, an Prozessen wie Replikation, Transkription, Translation, Detoxifikation, Proteinmodifikation sowie Metabolismus beteiligt bzw. auf Grund hoher Sequenzübereinstimmungen zu bereits untersuchten Proteinen den genannten Funktionsklassen zuzuordnen. Darüber hinaus konnten zwölf Proteine (Bez.: PTAC) unbekannter Funktion identifiziert werden. Computerbasierenden Analysen zu Folge handelt es sich bei fünf dieser Proteine um DNA/RNA-Binde-Proteine. Die biochemische Aufreinigung von DNA/RNA-Binde-Proteinen aus einer angereicherten TAC-Fraktion mittels Heparin-Sepharose-Chromatographie führte zur Isolation von neun der 26 identifizierten TAC-Proteine. Ein Vergleich der identifizierten Proteine aus *Arabidopsis thaliana* und *Sinapis alba* lässt auf eine entwicklungsbedingte Proteinzusammensetzung des TAC-Komplexes schließen.

Bei der Sichtung von *knock-out*-Mutanten wurden drei *Arabidopsis*-Linien, *atpl1*, *atpl2* und *atpl3*, korrespondierend zu denen im TAC ermittelten Proteinen PTAC2 (*atpl1*), PTAC6 (*atpl2*) und PTAC12 (*atpl3*), identifiziert. Die Mutanten *atpl1* und *atpl3* weisen einen bleichgrünen und *atpl2* einen bleichen Phänotyp auf. Die T-DNA-Insertionen in den korrespondierenden Genen *ptac2* (At1g74850), *ptac6* (At1g21600) und *ptac12* (At2g34640) bewirkt eine Keimlingsletalität homozygoter Pflanzen unter autotrophen Anzuchtbedingungen. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Chloroplasten der Mutanten *atpl1*, *atpl2* und *atpl3* zeigen vielfältige ultrastrukturelle Veränderungen insbesondere der photosynthetischen Membranstrukturen, was auf eine eingeschränkte Chloroplastenvitalität schließen lässt.

Aus Segregationsanalysen kann geschlussfolgert werden, dass in den untersuchten Linien der Phänotyp sowie die Kanamycinresistenz an die Mutation gekoppelt ist. Die T-DNA-Insertionen wurden durch Sequenzieretechniken verifiziert. Wie aus Expressionsanalysen der untersuchten Gene in den entsprechenden homozygoten Pflanzen hervorgeht, verhindern die T-DNA-Insertionen die Akkumulation der jeweiligen mRNAs, so dass keine Transkripte in den Mutanten zu detektieren sind.

In Datenbankanalysen konnten keine Proteine mit bekannter Funktion gefunden werden, die Homologien zu PTAC2, PTAC6 und PTAC12 aufweisen, so dass keine Rückschlüsse diesbezüglich möglich sind. Bioinformatische Studien der Proteinsequenz von PTAC2, PTAC6 sowie PTAC12 besagen eine plastidäre Lokalisation. Bei computerbasierenden Strukturuntersuchungen konnten für PTAC2 die beiden Nukleinsäurenbindemotive PPR und SMR sowie die an Protein-Protein-Interaktion beteiligten TPR-Domänen identifiziert werden (Moreira *et al.*, 1999; Blatch und Lässle, 1999; Small und Peeters, 2000). PTAC6 und PTAC12 konnten keine bekannten Domänen zugeordnet werden.

Erste gewebespezifische Untersuchungen der Transkriptakkumulation deuten auf eine konstitutive Expression der Gene *ptac2* und *ptac6*. Dagegen unterliegt *ptac12* einer gewebe- und entwicklungsspezifischen Expression.

*Northern-blot*-Analysen sowie *macroarray*-Untersuchungen zu Folge bewirkt die Inaktivierung von *ptac2*, *ptac6* und *ptac12* quantitative und qualitative Unterschiede in der Transkriptakkumulation plastidärer Gene, die durch die unterschiedliche Nutzung von

---

Transkriptionsinitiationsstellen, veränderte Prozessierungseigenschaften der polyzistronischen Transkriptionseinheiten, eine verringerte RNA-Stabilität oder unterschiedliche Transkriptionsterminationssignale hervorgerufen werden können. Darüber hinaus ist in *atp11* eine Reduktion der Transkriptionsrate von *atpB* zu beobachten. Die Defizienz der Transkriptakkumulation plastidärer Gene spiegelt sich auch auf Proteinebene wider, wie durch immunologische Studien nachgewiesen werden konnte.

Aus diesen Ergebnissen sowie aus dem Expressionsmuster von *ptac2* und *ptac6* kann entnommen werden, dass es sich um konstitutive Faktoren der plastidären Genexpression handelt. Dagegen könnte *ptac12* an spezifischen regulatorischen Prozessen während der frühen Genexpression mitwirken.

## VI. Literaturverzeichnis

**Adams KL, Palmer JD.** (2003). Evolution of mitochondrial gene content: gene loss and transfer to the nucleus. *Mol Phylogenet Evol.* 29, 380-395.

**Adamska I, Klopstech K, Ohad. I** (1993). Early light-inducible protein in pea is stable during light stress but is degraded during recovery at low light intensity. *J Biol Chem.* 268, 5438-5444.

**Abdallah F, Salamini F, Leister D.** (2000). A prediction of the size and evolutionary origin of the proteome of chloroplasts of *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci.* 5, 141–142 .

**Allison LA.** (2000). The role of sigma factors in plastid transcription. *Biochimie.* 82, 537-48.

**Allison LA, Simon LD, Maliga, P.** (1996). Deletion of *rpoB* reveals a second distinct transcription system in plastids of higher plants. *EMBO J.* 15, 2802-2809.

**Altermann E, Klein JR, Henrich B.** (1999). Synthesis and automated detection of fluorescently labeled primer extension products. *Biotechniques.* 26, 96-98, 101.

**Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang JH, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ.** (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389-3402.

**Andersson SG, Zomorodipour A, Andersson JO, Sicheritz-Ponten T, Alsmark UC, Podowski RM, Naslund AK, Eriksson AS, Winkler HH, Kurland CG.** (1998). The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature.* 12; 133-140.

**Apweiler R, Attwood TK, Bairoch A, Bateman A, Birney E, Biswas M, Bucher P, Cerutti L, Corpet F, Croning MD, Durbin R, Falquet L, Fleischmann W, Gouzy J, Hermjakob H, Hulo N, Jonassen I, Kahn D, Kanapin A, Karavidopoulou Y, Lopez R, Marx B, Mulder NJ, Oinn TM, Pagni M, Servant F, Sigrist CJ, Zdobnov EM; InterPro Consortium.** (2000). InterPro--an integrated documentation resource for protein families, domains and functional sites. *Bioinformatics.* 16, 1145-1150.

**Aravind L, Koonin EV.** (2000). SAP - a putative DNA-binding motif involved in chromosomal organization. *Trends Biochem Sci.* 25, 112-114.

**Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K.** (eds) (1989). *Current Protocols in Molecular Biology*, p. 4.10.16, Green Publishing Associates and Wiley-Interscience Publishers, New York.

**Avliyakov NK, Lukes J, Ray DS.** (2004). Mitochondrial histone-like DNA-binding proteins are essential for normal cell growth and mitochondrial function in *Crithidia fasciculata*. *Eukaryot Cell*. 3, 518-26.

**Babiychuk E, Fuangthong M, Van Montagu M, Inze D, Kushnir S.** (1997). Efficient gene tagging in *Arabidopsis thaliana* using a gene trap approach. *Proc Natl Acad Sci*. 94, 12722-7.

**Baginsky S, Tiller K, Pfannschmidt T, Link G.** (1999). PTK, the chloroplast RNA polymerase-associated protein kinase from mustard (*Sinapis alba* L.), mediates redox control of plastid *in vitro* transcription. *Plant Mol. Biol.* 39, 1013-1023.

**Baginsky S, Tiller K, Link G.** (1997). Transcription factor phosphorylation by a protein kinase associated with chloroplast RNA polymerase from mustard (*Sinapis alba*). *Plant Mol. Biol.* 34, 181-189.

**Bailly V, Lauder S, Prakash S, Prakash L.** (1997). Yeast DNA repair proteins Rad6 and Rad18 form a heterodimer that has ubiquitin conjugating, DNA binding, and ATP hydrolytic activities. *J Biol Chem*. 272, 23360-5.

**Balmer Y, Koller A, del Val G, Manieri W, Schurmann P, Buchanan BB.** (2003). Proteomics gives insight into the regulatory function of chloroplast thioredoxins *Proc Natl Acad Sci USA*. 100, 370-375.

**Bannister JV, Bannister WH, Rotilio G.** (1987). Aspects of the structure, function, and applications of superoxide dismutase. *Crit. Rev. Biochem.* 22, 111- 154.

**Barber J, Andersson B.** (1992). Too much of a good thing: light can be bad for photosynthesis. *Trends Biochem. Sci.* 17, 61-66.

**Barkan A, Goldschmidt-Clermont M.** (2000). Participation of nuclear genes in chloroplast gene expression. *Biochimie*. 82, 559-572.

**Barkan A, Walker M, Nolasco M, Johnson D.** (1994). A nuclear mutation in maize blocks the processing and translation of several chloroplast mRNAs and provides evidence for the differential translation of alternative mRNA forms. *EMBO J.* 13, 3170-3181.

**Barkan A.** (1988). Proteins encoded by a complex chloroplast transcription unit are each translated from both monocistronic and polycistronic mRNAs. *EMBO J.* 7, 2637-2644.

**Bateman A, Birney E, Durbin R, Eddy SR, Howe KL, Sonnhammer EL.** (2000). The Pfam Protein Families Database. *Nucleic Acids Res.* 28, 263-6.

**Baumgartner BJ, Rapp JC, Mullet JE.** (1998). Plastid transcription activity and DNA copy number increase early in barley chloroplast development. *Plant Physiol.* 89, 1011–1018.

**Baumgartner BJ, Rapp JC, Mullet JE.** (1993). Plastid genes encoding the transcription/translation apparatus are differentially transcribed early in barley (*Hordeum vulgare*) chloroplast development. *Plant Physiol.* 101, 781-791.

**Bendich AJ.** (2004). Circular chloroplast chromosomes: the grand illusion. *Plant Cell.* 16, 1661-1666.

**Bendich AJ.** (1987). Why do chloroplasts and mitochondria contain so many copies of their genome? *Bioessays.* 6, 279-282.

**Birnboim HC, Doly J.** (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research.* 7, 1513-1524.

**Bisanz C, Begot L, Carol P, Perez P, Bligny M, Pesey H, Gallois JL, Lerbs-Mache S, Mache R.** (2003). The *Arabidopsis* nuclear DAL gene encodes a chloroplast protein which is required for the maturation of the plastid ribosomal RNAs and is essential for chloroplast differentiation. *Plant Mol Biol.* 51, 651-663.

**Blatch GL, Lassel M.** (1999). The tetratricopeptide repeat: a structural motif mediating protein-protein interactions. *Bioessays.* 21, 932-9.

**Bligny M, Courtois F, Thamiy S, Chang CC, Lagrange T, Baruah-Wolff J, Stern D, Lerbs-Mache S.** (2000). Regulation of plastid rDNA transcription by interaction of CDF2 with two different RNA polymerases. *EMBO J.* 19, 1851-60.

**Blum M, Beier H, Gross HJ.** (1987). Improved silverstaining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamid gels. *Electrophoresis.* 8, 93-99.

**Boni IV, Isaeva DM, Musychenko ML, Tzareva NV.** (1991). Ribosome-messenger recognition: mRNA target sites for ribosomal protein S1. *Nucleic Acids Res.* 19, 155–162.

**Boudreau E, Nickelsen J, Lemaire SD, Ossenbuhl F, Rochaix JD.** (2000). The *Nac2* gene of *Chlamydomonas* encodes a chloroplast TPR-like protein involved in *psbD* mRNA stability. *EMBO J.* 19, 3366-3376.

**Bowler C, Van Montague M, Inze D.** (1992). Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 43, 83-116.

**Bradford MM.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry,* 72, 248-254.

- Braithwaite DK, Ito J.** (1993). Compilation, alignment, and phylogenetic relationships of DNA polymerases. *Nucleic Acids Res.* 21, 787–802.
- Briat JF, Mache R.** (1980). Properties and characterization of a spinach chloroplast RNA polymerase isolated from a transcriptionally active DNA-protein complex. *Eur J Biochem.* 111, 503-509.
- Brown EC, Somanchi A, Mayfield SP.** (2001). Interorganellar crosstalk: new perspectives on signaling from the chloroplast to the nucleus. *Genome Biol.* 2, 1021.
- Buchanan BB, Schürmann P, Jacquot JP.** (1994). Thioredoxin and metabolic regulation. *Semin Cell Biol.* 5, 285-93.
- Bullock WO, Fernandez JM, Short JM.** (1987). XL 1–Blue: A high efficiency plasmid transforming recA *Escherichia coli* strain with beta–galactosidase selection. *BioTechniques.* 5, 376–378.
- Bülow S, Reiss T, Link G.** (1987). DNA-binding proteins of the transcriptionally active chromosome from mustard (*Sinapis alba* L.) chloroplasts. *Curr Genet.* 12, 157–159.
- Cadenas E.** (1989). Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu Rev Biochem.* 58, 79-110.
- Cahoon AB, Harris FM, Stern DB.** (2004). Analysis of developing maize plastids reveals two mRNA stability classes correlating with RNA polymerase type. *EMBO Rep.* 5, 801-806.
- Cannon GC, Ward LN, Case CI, Heinhorst S.** (1999). The 68 kDa DNA compacting nucleoid protein from soybean chloroplasts inhibits DNA synthesis in vitro. *Plant Mol Biol.* 39, 835-845.
- Casano LM, Martin M, Sabater B.** (2001). Hydrogen peroxide mediates the induction of chloroplastic Ndh complex under photooxidative stress in barley. *Plant Physiol.* 125, 1450-1458.
- Certa U, Colavito-Shepanski M, Grunstein M.** (1984). Yeast may not contain histone H1: the only known 'histone H1-like' protein in *Saccharomyces cerevisiae* is a mitochondrial protein. *Nucleic Acids Res.* 12, 7975-7985.
- Chang CC, Sheen J, Bligny M, Niwa, Y, Lerbs-Mache S, Stern DB.** (1999). Functional analysis of two maize cDNAs encoding T7-like RNA polymerases. *Plant Cell.* 11, 911-926.
- Chatterjee M, Sparvoli S, Edmunds C, Garosi P, Findlay K, Martin C.** (1996). DAG, a gene required for chloroplast differentiation and palisade development in *Antirrhinum majus*. *EMBO J.* 15, 4194-4207.

- Chi-Ham CL, Keaton MA, Cannon GC, Heinhorst S.** (2002). The DNA-compacting protein DCP68 from soybean chloroplasts is ferredoxin:sulfite reductase and co-localizes with the organellar nucleoid. *Plant Mol Biol.* 49, 621-631.
- Choquet Y, Wostrikoff K, Rimbault B, Zito F, Girard-Bascou J, Drapier D, Wollman FA.** (2001). Assembly-controlled regulation of chloroplast gene translation. *Biochem Soc Trans.* 29, 421-426.
- Cline K, Henry R.** (1996). Import and routing of nucleus-encoded chloroplast proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 12, 1-26.
- Cyr DM, Langer T, Douglas MG.** (1994). DnaJ-like proteins: molecular chaperones and specific regulators of Hsp70. *Trends Biochem. Sci.* 19, 176- 181.
- da Costa e Silva O, Lorbiecke R, Garg P, Muller L, Wassmann M, Lauert P, Scanlon M, Hsia AP, Schnable PS, Krupinska K, Wienand U.** (2004). The Etched1 gene of *Zea mays* (L.) encodes a zinc ribbon protein that belongs to the transcriptionally active chromosome (TAC) of plastids and is similar to the transcription factor TFIIS. *Plant J.* 38, 923-939.
- D'andrea LD, Regan L.** (2003). TPR proteins: the versatile helix. *Trends Biochem. Sci.* 28, 655- 662.
- Das AK, Cohen PW, Barford D.** (1998). The structure of the tetratricopeptide repeats of protein phosphatase 5: implications for TPR-mediated protein-protein interactions. *EMBO J.* 17, 1192- 1199.
- Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB.** (1983). A plant DNA minipreparation: version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1, 19-21.
- dePamphilis CW, Palmer JD.** (1990). Loss of photosynthetic and chlororespiratory genes from the plastid genome of a parasitic flowering plant. *Nature.* 348, 337-339.
- De Santis-MacIossek G, Kofer W, Bock A, Schoch S, Maier RM, Wanner G, Rudiger W, Koop HU, Herrmann RG.** (1999). Targeted disruption of the plastid RNA polymerase genes *rpoA*, *B* and *C1*: molecular biology, biochemistry and ultrastructure. *Plant J.* 18, 477-489.
- Desveaux D, Allard J, Brisson N, Sygusch J.** (2002). Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of p24, a component of the potato nuclear factor PBF-2. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 58, 296-8.
- Dinkins RD, Bandaranayake H, Baeza L, Griffiths AJ, Green BR.** (1997). *hcf5*, a nuclear photosynthetic electron transport mutant of *Arabidopsis thaliana* with a pleiotropic effect on chloroplast gene expression. *Plant Physiol.* 113, 1023-1031.

- Drlica K, Rouviere-Yaniv J.** (1987). Histonelike proteins of bacteria. *Microbiol Rev.* 51, 301-319.
- Durbin ML, Learn GH Jr, Huttley GA, Clegg MT.** (1995). Evolution of the chalcone synthase gene family in the genus *Ipomoea*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 92, 3338-3342.
- Dworkin J, Jovanovic G, Model P.** (2000). The PspA protein of *Escherichia coli* is a negative regulator of sigma(54)-dependent transcription. *J Bacteriol.* 182, 311-9.
- Eisen JA.** (1998). A phylogenomic study of the MutS family of proteins. *Nucleic Acids Res.* 26, 4291-300.
- Emanuelsson O, Nielsen H, Brunak S, von Heijne G.** (2000). Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J. Mol. Biol.* 300, 1005-1016.
- Emanuelsson O, Nielsen H, von Heijne G.** (1999). ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites. *Protein Sci.* 8, 978-984.
- Emelyanov VV.** (2003). Mitochondrial connection to the origin of the eukaryotic cell. *Eur J Biochem.* 270, 1599-1618.
- Falk J, Schmidt A, Krupinska K.** (1993). Characterization of plastid DNA transcription in ribosome deficient plastids of heat-bleached barley leaves. *J Biol Chem.* 248, 7215-7222.
- Falquet L, Pagni M, Bucher P, Hulo N, Sigrist CJ, Hofmann K, Bairoch A.** (2002). *The PROSITE database, its status in 2002.* *Nucleic Acids Res.* 30, 235-238.
- Feinberg AP, Vogelstein B.** (1984). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Analytic Biochemistry.* 132, 2-13.
- Fisk DG, Walker MB, Barkan A.** (1999). Molecular cloning of the maize gene *crp1* reveals similarity between regulators of mitochondrial and chloroplast gene expression. *EMBO J.* 18, 2621-30.
- Fong SE, Surczycki SJ.** (1992). Chloroplast RNA polymerase genes of *Chlamydomonas reinhardtii* exhibit an unusual structure and arrangement. *Curr Genet.* 21, 485-497.
- Foster SJ.** (1991). Cloning, expression, sequence analysis and biochemical characterization of an autolytic amidase of *Bacillus subtilis* 168 *trpC2*. *J. Gen. Microbiol.* 137, 1987- 1998.
- Fridovich I.** (1978). The biology of oxygen radicals. *Science.* 201, 875-880.

- Fujiwara M, Nagashima A, Kanamaru K, Tanaka K, Takahashi H.** (2000). Three new nuclear genes, sigD, sigE and sigF, encoding putative plastid RNA polymerase sigma factors in *Arabidopsis thaliana*. FEBS Lett. 481, 47-52.
- Goffeau A, Barrell BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, Feldmann H, Galibert F, Hoheisel JD, Jacq C, Johnston M, Louis EJ, Mewes HW, Murakami Y, Philippsen P, Tettelin H, Oliver SG.** (1996). Life with 6000 genes. Science. 274, 563-7.
- Gohring F, Schwab BL, Nicotera P, Leist M, Fackelmayer FO.** (1997). The novel SAR-binding domain of scaffold attachment factor A (SAF-A) is a target in apoptotic nuclear breakdown. EMBO J. 16, 7361-71.
- Goldschmidt-Clermont M.** (1998). Coordination of nuclear and chloroplast gene expression in plant cells. Int Rev Cytol. 177, 115-180.
- Graumann P, Schroder K, Schmid R, Marahiel MA.** (1996). Cold shock stress-induced proteins in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 178, 4611-4619.
- Gray JC, Sullivan JA, Wang JH, Jerome CA, MacLean D.** (2003). Coordination of plastid and nuclear gene expression. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 358, 135-144.
- Gray MW, Burger G, Lang BF.** (2001). The origin and early evolution of mitochondria. Genome Biol. 2, 1018.
- Gray MW.** (1999). Evolution of organellar genomes. Curr Opin Genet Dev. 9, 678-687.
- Gruissem W.** (1989). Chloroplast gene expression: how plants turn their plastids on. Cell. 56, 161-170.
- Hajdukiewicz PTJ, Allison LA, Maliga P.** (1997). The two RNA polymerases encoded by the nuclear and the plastid compartments transcribe distinct groups of genes in tobacco plastids. EMBO J. 16, 4041-4048.
- Hallick RB, Hong L, Drager RG, Favreau MR, Monfort A, Orsat B, Spielmann A, Stutz E.** (1993). Complete sequence of *Euglena gracilis* chloroplast DNA. Nucleic Acids Res. 21, 3537-3544.
- Hallick RB, Lipper C, Richards OC, Rutter WJ.** (1976). Isolation of a transcriptionally active chromosome from chloroplasts of *Euglena gracilis*. Biochemistry. 15, 3039-3045.
- Hanahan D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J Mol Biol. 166, 557-580.
- Hashimoto M, Endo T, Peltier G, Tasaka M, Shikanai T.** (2003). A nucleus-encoded factor, CRR2, is essential for the expression of chloroplast ndhB in *Arabidopsis*. Plant J. 36, 541-549.

**Hedtke B, Legen J, Weihe A, Herrmann RG, Börner T.** (2002). Six active phage-type RNA polymerase genes in *Nicotiana tabacum*. *Plant J.* 30, 625-637.

**Hedtke B, Börner T, Weihe A.** (2000). One RNA polymerase serving two genomes. *EMBO Rep.* 1, 435-440.

**Hedtke B, Boerner T, Weihe A.** (1997). Mitochondrial and chloroplast phage-type RNA polymerases in *Arabidopsis*. *Science* 277, 809-811.

**Herrmann RG, Maier RM, Schmitz-Linneweber C.** (2003). Eukaryotic genome evolution: rearrangement and coevolution of compartmentalized genetic information. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 358, 87-97.

**Herrmann RG.** (1997). Eukaryotism, Towards a New Interpretation. In: *Eukaryotism and Symbiosis*. Schenk HEA, Herrmann RG, Jeon KW, Müller NE, Schwemmler W. (eds.), Springer, Heidelberg, 73-118.

**Herrmann RG, Westhoff P, Link G.** (1992). Chloroplast biogenesis in higher plants. In *Cell Organelles* (Herrmann RG, ed.). Springer-Verlag, Wien, Heidelberg, New York. pp. 275-349.

**Herrmann RG, Bohnert HJ, Kowallik KV, Schmitt JM.** (1975). Size, conformation and purity of chloroplast DNA of some higher plants. *Biochim. Biophys. Acta* 378, 305-317.

**Hess WR, Börner T.** (1999). Organellar RNA polymerases of higher plants. *Int. Rev. Cytol.* 190, 1-59.

**Hess WR, Prombona A, Fieder B, Subramanian AR, Börner T.** (1993). Chloroplast *rps15* and the *rpoB/C1/C2* gene cluster are strongly transcribed in ribosome deficient plastids: evidence for a functioning non-chloroplast-encoded RNA polymerase. *EMBO J.* 12, 563-571.

**Hiratsuka J, Shimada H, Whittier R, Ishibashi T, Sakamoto M, Mori M, Kondo C, Honji Y, Sun CR, Meng BY, et al.** (1989). The complete sequence of the rice (*Oryza sativa*) chloroplast genome: intermolecular recombination between distinct tRNA genes accounts for a major plastid DNA inversion during the evolution of the cereals. *Mol Gen Genet.* 217, 185-94.

**Hu J, 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.

**Igloi GL, Kössel H.** (1992). The transcriptional apparatus of chloroplast. *Crit Rev Plant Sci.* 10, 525-558.

**Ikeda TM, Gray MW.** (1999). Identification and characterization of T7/T3 bacteriophage-like RNA polymerase sequences in wheat. *Plant Mol. Biol.* 40, 567-578.

**Ishihama A.** (1988). Promoter selectivity of prokaryotic RNA polymerases. *Trends Genet.* 4, 282-286.

**Jeong SY, Peffer N, Meier I.** (2004). Phosphorylation by protein kinase CKII modulates the DNA-binding activity of a chloroplast nucleoid-associated protein. *Planta*. 219, 298-302.

**Jeong SY, Rose A, Meier I.** (2003). MFP1 is a thylakoid-associated, nucleoid-binding protein with a coiled-coil structure. *Nucleic Acids Res.* 31, 5175-5185.

**Johnston M, Hillier L, Riles L, Albermann K, Andre B, Ansorge W, Benes V, Bruckner M, Delius H, Dubois E, Dusterhoft A, Entian KD, Floeth M, Goffeau A, Hebling U, Heumann K, Heuss-Neitzel D, Hilbert H, Hilger F, Kleine K, Kotter P, Louis EJ, Messenguy F, Mewes HW, Hoheisel JD, et al.** (1997). The nucleotide sequence of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome XII. *Nature*. 387, 87-90.

**Kandlbinder A, Finkemeier I, Wormuth D, Hanitzsch M, Dietz KJ.** (2004). The antioxidant status of photosynthesizing leaves under nutrient deficiency: redox regulation, gene expression and antioxidant activity in *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Plant*. 120, 63-73.

**Kapoor S, Sugiura M.** (1999). Identification of two essential sequence elements in the nonconsensus Type II PatpB-290 plastid promoter by using plastid transcription extracts from cultured tobacco BY-2 cells. *Plant Cell*. 11, 1799-1810.

**Kapoor S, Suzuki J Y, Sugiura M.** (1997). Identification and functional significance of a new class of non-consensus-type plastid promoters. *Plant J.* 11, 327-337.

**Kato Y, Murakami S, Yamamoto Y, Chatani H, Kondo Y, Nakano T, Yokota A, Sato F.** (2004). The DNA-binding protease, CND41, and the degradation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in senescent leaves of tobacco. *Planta*. 14 [Epub ahead of print].

**Kimura S, Uchiyama Y, Kasai N, Namekawa S, Saotome A, Ueda T, Ando T, Ishibashi T, Oshige M, Furukawa T, Yamamoto T, Hashimoto J, Sakaguchi K.** (2002). A novel DNA polymerase homologous to *Escherichia coli* DNA polymerase I from a higher plant, rice (*Oryza sativa* L.). *Nucleic Acids Res.* 30, 1585-92.

**Kobayashi T, Takahara M, Miyagishima SY, Kuroiwa H, Sasaki N, Ohta N, Matsuzaki M, Kuroiwa T.** (2002). Detection and localization of a chloroplast-encoded HU-like protein that organizes chloroplast nucleoids. *Plant Cell*. 14, 1579-1589.

**Kolodner R, Tewari KK.** (1972). Molecular size and conformation of chloroplast deoxyribonucleic acid from pea leaves. *J Biol Chem*. 247, 6355-6364.

**Krause K, Maier RM, Kofer W, Krupinska K, Herrmann RG.** (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.

**Krause, K, Krupinska K.** (2000). Molecular and functional properties of highly purified transcriptionally active chromosomes from spinach chloroplasts. *Physiol. Plant.* 109, 188-195.

**Kroll D, Meierhoff K, Bechtold N, Kinoshita M, Westphal S, Vothknecht UC, Soll J, Westhoff P.** (2001). VIPP1, a nuclear gene of *Arabidopsis thaliana* essential for thylakoid membrane formation. *Proc Natl Acad Sci.* 98, 4238-42.

**Krupinska K, Falk J.** (1994). Changes in RNA polymerase activity during development and senescence of barley chloroplasts. Comparative analysis of transcripts synthesized either in run-on assays or by transcriptionally active chromosomes (TAC). *J Plant Physiol.* 143, 298-305.

**Krysan PJ, Young JC, Sussman MR.** (1999). T-DNA as an insertional mutagen in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 11, 2283-90.

**Kurland CG, Andersson SG.** (2000). Origin and evolution of the mitochondrial proteome. *Microbiol Mol Biol Rev.* 64, 786-820.

**Kuroiwa T, Suzuki T.** (1981). Circular nucleoids isolated from chloroplasts in a brown alga *Ectocarpus siliculosus*. *Exp Cell Res.* 134, 457-461.

**Laemmli UK.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 660-685.

**Lamb JR, Tugendreich S.** (1995). Hierarchical peptide repeat interactions: to TPR or not to TPR? *Trends Biochem. Sci.* 20, 257- 259.

**Lambowitz AM, Caprara MG, Zimmerly S, Perlman PS.** (1999). Group I and group II ribozymes as RNPs: clues to the past and guides to the future. In Gesteland, R.F., Cech, T.R. and Atkins, J.F. (eds), *The RNA World*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 451-485.

**Legen J, Kemp S, Krause K, Profanter B, Herrmann RG, Maier RM.** (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.

**Lerbs-Mache S.** (1993). The 110-kDa polypeptide of spinach plastid DNA-dependent RNA polymerase: single-subunit enzyme or catalytic core of multimeric enzyme complexes? *Proc Natl Acad Sci USA.* 90, 5509-5513.

**Lerbs-Mache S.** (1988). Quantification of DNA-dependent RNA polymerase subunits and initiation factor(s) by antibody-linked polymerase assays. *FEBS Lett.* 234, 392-394.

**Li HM, Kaneko Y, Keegstra K.** (1994). Molecular cloning of a chloroplastic protein associated with both the envelope and thylakoid membranes. *Plant Mol. Biol.* 25, 619-632.

**Link G.** (2003). Redox regulation of chloroplast transcription. *Antioxid Redox Signal.* 5, 79-87.

**Liberek K, Marszalek J, Ang D, Georgopoulos C, Zyllicz M.** (1991). Escherichia coli DnaJ and GrpE heat shock proteins jointly stimulate ATPase activity of DnaK. *Proc Natl Acad Sci.* 88, 2874-2878.

**Liere K, Kaden D, Maliga P, Borner T.** (2004). Overexpression of phage-type RNA polymerase RpoTp in tobacco demonstrates its role in chloroplast transcription by recognizing a distinct promoter type. 32, 1159-1165.

**Liere K, Maliga P.** (1999). In vitro characterization of the tobacco rpoB promoter reveals a core sequence motif conserved between phage-type plastid and plant mitochondrial promoters. *EMBO J.* 18, 249-257.

**Liere K, Kestermann M, Muller U, Link G.** (1995). Identification and characterization of the Arabidopsis thaliana chloroplast DNA region containing the genes psbA, trnH and rps19'. *Curr Genet.* 28, 128-130.

**Link, G.** (1996). Green life: control of chloroplast gene expression. *BioEssays* 18, 465-472.

**Liu K, Hanna MM.** (1995). NusA interferes with interactions between the nascent RNA and the C-terminal domain of the alpha subunit of RNA polymerase in Escherichia coli transcription complexes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 92, 5012-5026.

**Long SB, Hancock PJ, Kral AM, Hellinga HW, Beese LS.** (2001). The crystal structure of human protein farnesyltransferase reveals the basis for inhibition by CaaX tetrapeptides and their mimetics. *Proc Natl Acad Sci USA.* 98, 12948-12953.

**Loschelder H, Homann A, Ogrzewalla K, Link G.** (2004). Proteomics-based sequence analysis of plant gene expression--the chloroplast transcription apparatus. *Phytochemistry.* 65, 1785-1793.

**Lurin C, Andres C, Aubourg S, Bellaoui M, Bitton F, Bruyere C, Caboche M, Debast C, Gualberto J, Hoffmann B, Lecharny A, Le Ret M, Martin-Magniette ML, Mireau H, Peeters N, Renou JP, Szurek B, Tacconnat L, Small I.** (2004). Genome-wide analysis of Arabidopsis pentatricopeptide repeat proteins reveals their essential role in organelle biogenesis. *Plant Cell.* 16, 2089-2103.

**Lüttke A, Bonotto S.** (1981). Chloroplast DNA of Acetabularia mediterranea: cell cycle related changes in distribution. *Planta.* 153, 536-542.

**Maier RM, Zeltz P, Kössel H, Bonnard G, Gualberto JM, Grienberger JM.** (1996). RNA editing in plant mitochondria and chloroplasts. *Plant Mol. Biol.* 32, 343-365.

- Maier RM, Neckermann K, Igloi GL, Kössel H.** (1995). Complete sequence of the maize chloroplast genome: gene content, hotspots of divergence and fine tuning of genetic information by transcript editing. *J Mol Biol.* 251, 614-628.
- Martin W.** (2003). Gene transfer from organelles to the nucleus: frequent and in big chunks. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100, 8612-8614.
- Martin W, Rujan T, Richly E, Hansen A, Cornelsen S, Lins T, Leister D, Stoebe B, Hasegawa M, Penny D.** (2002). Evolutionary analysis of Arabidopsis, cyanobacterial, and chloroplast genomes reveals plastid phylogeny and thousands of cyanobacterial genes in the nucleus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 99, 12246-12251.
- Martin W, Müller M.** 1998a. The hydrogen hypothesis for the first eukaryote. *Nature.* 392, 37-41.
- Martin W, Herrmann RG.** (1998b). Gene transfer from organelles to the nucleus: how much, what happens, and Why? *Plant Physiol.* 118, 9-17.
- Maurizi MR, Clark WP, Kim SH, Gottesman S.** (1990). Clp P represents a unique family of serine proteases. *J Biol Chem.* 265, 12546-52.
- McFadden GI.** (2001). Chloroplast origin and integration. *Plant Physiol.* 125, 50-53.
- Mereschowsky C.** (1905). Über die Natur und den Ursprung der Chromatophoren im Pflanzenreiche. *Biologisches Zentralblatt.* 25, 593-604 und 989-691.
- Michaels ML, Miller JH.** (1992). The GO-system protects organisms from the mutagenic effect of the spontaneous lesion 8-hydroxyguanine (7,8-dihydro-8-oxoguanine). *J Bacteriol.* 174, 6321-6325.
- Modrich P, Lahue R.** (1996). Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology. *Annu Rev Biochem.* 65, 101-133.
- Monde RA, Schuster G, Stern DB.** (2000). Processing and degradation of chloroplast mRNA. *Biochimie.* 82, 573-582.
- Morden CW, Wolfe KH, dePamphilis CW, Palmer JD.** (1991). Plastid translation and transcription genes in a non-photosynthetic plant: intact, missing and pseudo genes. *EMBO J.* 10, 3281-3288.
- Moreira D, Philippe H.** (1999). Smr: a bacterial and eukaryotic homologue of the C-terminal region of the MutS2 family. *Trends Biochem Sci.* 24, 298-300.

**Morikawa K, Shiina T, Murakami S, Toyoshima Y.** (2002). Novel nuclear-encoded proteins interacting with a plastid sigma factor, Sig1, in *Arabidopsis thaliana*. FEBS Lett. 514, 300-304.

**Mortz E, Vorm O, Mann M, Roepstorff P.** (1994). Identification of proteins in polyacrylamide gels by mass spectrometric peptide mapping combined with database search. Biol Mass Spectrom. 23, 249-261.

**Mullet JE, Klein RR.** (1987). Transcription and RNA stability are important determinants of higher plant chloroplast RNA levels. EMBO J. 6, 1571–1579.

**Murashige T, Skoog F.** (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiologica Plantarum. 15, 473-497.

**Nakano T, Murakami S, Shoji T, Yoshida S, Yamada Y, Sato F.** (1997). A novel protein with DNA binding activity from tobacco chloroplast nuclei. Plant Cell 9, 1673–1682.

**Narita JO, Rushlow KE, Hallick RB.** (1985). Characterization of a *Euglena gracilis* chloroplast RNA polymerase specific for ribosomal RNA genes. J Biol Chem. 260, 11194-9.

**Nemoto Y, Kawano S, Nagata T, Kuroiwa T.** (1991). Studies on plastid-nuclei (nucleoids) in *Nicotiana tabacum* L. IV. Association of chloroplast-DNA with proteins at several specific sites in isolated chloroplast-nuclei. Plant Cell Physiol. 32, 131–141.

**Nickelsen J.** (2003). Chloroplast RNA-binding proteins. Curr Genet. 43, 392-399.

**Nickelsen J, van Dillewijn J, Rahire M, Rochaix JD.** (1994). Determinants for stability of the chloroplast psbD RNA are located within its short leader region in *Chlamydomonas reinhardtii*. EMBO J. 13, 3182-3191.

**Ogrzewalla K, Piotrowski M, Reinbothe S, Link G.** (2002). The plastid transcription kinase from mustard (*Sinapis alba* L.). A nuclear-encoded CK2-type chloroplast enzyme with redox-sensitive function. Eur J Biochem. 269, 3329-37.

**Ogrzewalla K.** (2001). Klonierung und Funktionsanalyse regulatorischer Komponenten des plastidären Transkriptionsapparates. Dissertation, Ruhr-Universität Bochum.

**Oldenburg DJ, Bendich AJ.** (2004). Most chloroplast DNA of maize seedlings in linear molecules with defined ends and branched forms. J Mol Biol. 335, 953-970.

**Orozco EM Jr, Chen LJ, Eilers RJ.** (1990). The divergently transcribed *rbcL* and *atpB* genes of tobacco plastid DNA are separated by nineteen base pairs. Curr Genet. 17, 65-71.

**Oswald O, Martin T, Dominy PJ, Graham IA.** (2001). Plastid redox state and sugars: interactive regulators of nuclear-encoded photosynthetic gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA.* 98, 2047-52.

**Padmasree K, Padmavathi L, Raghavendra AS.** (2002). Essentiality of mitochondrial oxidative metabolism for photosynthesis: optimization of carbon assimilation and protection against photoinhibition. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 37, 71-119.

**Pasternak C, Habertzettl K, Klug G.** (1999). Thioredoxin is involved in oxygen-regulated formation of the photosynthetic apparatus of *Rhodobacter sphaeroides*. *Bacteriol.* 181, 100-106.

**Pego JV, Smeekens SC.** (2000). Plant fructokinases: a sweet family get-together. *Trends Plant Sci.* 5, 531-536.

**Peltier G, Cournac L.** (2002). Chlororespiration. *Annu Rev Plant Biol.* 53, 523-550.

**Peskan T, Westermann M, Oelmuller R.** (2000). Identification of low-density Triton X-100-insoluble plasma membrane microdomains in higher plants. *Eur J Biochem.* 267, 6989-6995.

**Perron K, Goldschmidt-Clermont M, Rochaix JD.** (2004). A multiprotein complex involved in chloroplast group II intron splicing. *RNA.* 10, 704-711.

**Pfannschmidt T, Schutze K, Fey V, Sherameti I, Oelmuller R.** (2003). Chloroplast redox control of nuclear gene expression--a new class of plastid signals in interorganellar communication. *Antioxid Redox Signal.* 5, 95-101.

**Pfannschmidt T, Ogrzewalla K, Baginsky S, Sickmann A, Meyer HE, Link G.** (2000). The multisubunit chloroplast RNA polymerase A from mustard (*Sinapis alba* L.). Integration of a prokaryotic core into a larger complex with organelle-specific functions. *Eur J Biochem.* 267, 253-261.

**Pfannschmidt T, Link G.** (1997). The A and B forms of plastid DNA-dependent RNA polymerase from mustard (*Sinapis alba* L.) transcribe the same genes in a different developmental context. *Mol Gen Genet.* 257, 35-44.

**Pfannschmidt T, Link G.** (1994). Separation of two classes of plastid DNA-dependent RNA polymerases that are differentially expressed in mustard (*Sinapis alba* L.) seedlings. *Plant Mol Biol.* 25, 69-81.

**Price AH, Hendry GAF.** (1991). Iron-catalyzed oxygen radical formation and its possible contribution to drought damage in nine native grasses and three cereals. *Plant Cell Environ.* 14, 477-484.

**Privat I, Hakimi MA, Buhot L, Favory JJ, Mache-Lerbs S.** (2003). Characterization of Arabidopsis plastid sigma-like transcription factors SIG1, SIG2 and SIG3. *Plant Mol Biol.* 51, 385-399.

**Qi Y, Pei J, Grishin NV.** (2002). C-terminal domain of gyrase A is predicted to have a beta-propeller structure. *Proteins*. 47, 258-264.

**Reece RJ, Maxwell A.** (1991). DNA gyrase: structure and function. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 26, 335-375.

**Reiss T, Link G.** (1985). Characterization of transcriptionally active DNA-protein complexes from chloroplasts and etioplasts of mustard (*Sinapis alba* L.). *Eur. J. Biochem*. 148, 207-212.

**Reith M, Munholland J.** (1995). Complete nucleotide sequence of the *Porphyra purpurea* chloroplast genome. *Plant Mol Biol Rep*. 13, 333-335.

**Richly E, Leister D.** (2004). NUPTs in Sequenced Eukaryotes and Their Genomic Organization in Relation to NUMTs. *Mol Biol Evol*. 21, 72-80.

**Robinson NJ, Procter CM, Connolly EL, Guerinot ML.** (1999). A ferric-chelate reductase for iron uptake from soils. *Nature*. 397, 694-697.

**Rochaix JD.** (2001). Posttranscriptional control of chloroplast gene expression. From RNA to photosynthetic complex. *Plant Physiol*. 125, 142-144.

**Ross-Macdonald P, Roeder GS.** (1994). Mutation of a meiosis-specific MutS homolog decreases crossing over but not mismatch correction. *Cell*. 79, 1069-1080.

**Rott R, Levy H, Drager RG, Stern DB, Schuster G.** (1998). 3'-Processed mRNA is preferentially translated in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts. *Mol Cell Biol*. 18, 4605-4611.

**Rowan BA, Oldenburg DJ, Bendich AJ.** (2004). The demise of chloroplast DNA in Arabidopsis. *Curr Genet*. 46, 176-181.

**Rujan T, Martin W.** (2001). How many genes in Arabidopsis come from cyanobacteria? An estimate from 386 protein phylogenies. *Trends Genet*. 17, 113-120.

**Rushlow KE, Hallick RB.** (1982). The isolation and purification of a transcriptionally active chromosome from chloroplast of *Euglena gracilis*. In: Edelman M, Hallick RB, Chua N-H (eds) *methods in Chloroplast molecular Biology*. Elsevier, Amsterdam. 543-550.

**Rushlow KE, Orozco EM Jr, Lipper C, Hallick RB.** (1980). Selective in vitro transcription of *Euglena* chloroplast ribosomal RNA genes by a transcriptionally active chromosome. *J Biol Chem*. 255, 3786-3792.

- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA.** (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 239, 487-491.
- Saldanha R, Mohr G, Belfort M, Lambowitz AM.** (1993). Group I and group II introns. *FASEB J*. 7, 15-24.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T.** (1989). *Molecular cloning. A Laboratory Manual*, Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR.** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 74, 5463-5467.
- Sasaki Y, Nagano Y.** (2004). Plant acetyl-CoA carboxylase: structure, biosynthesis, regulation, and gene manipulation for plant breeding. *Biosci Biotechnol Biochem*. 68, 1175-84.
- Sasaki Y, Sekiguchi K, Nagano Y, Matsuno R.** (1993). Chloroplast envelope protein encoded by chloroplast genome. *FEBS Lett*. 316, 93-98.
- Sato N, Terasawa K, Miyajima K, Kabeya Y.** (2003). Organization, developmental dynamics, and evolution of plastid nucleoids. *Int Rev Cytol*. 232, 217-262.
- Sato N, Ohta N.** (2001). DNA-binding specificity and dimerization of the DNA-binding domain of the PEND protein in the chloroplast envelope membrane. *Nucleic Acids Res*. 29, 2244-2250.
- Sato N, Albrieux C, Joyard J, Douce R, Kuroiwa T.** (1993). Detection and characterization of a plastid envelope DNA-binding protein which may anchor plastid nucleoids. *EMBO J*. 12, 555-561.
- Sato S, Nakamura Y, Kaneko T, Asamizu E, Tabata S.** (1999). Complete structure of the chloroplast genome of *Arabidopsis thaliana*. *DNA Res*. 6, 283-290.
- Schimper AFW.** (1883). Über die Entwicklung der Chlorophyllkörner und Farbkörner. *Bot. Zeitung*. 41, 105-162.
- Schnell DJ.** (2000). Functions and origins of the chloroplast protein-import machinery. *Essays Biochem*. 36, 47-59.
- Schuler MA, Zielinski RE.** (1989). *Methods in Plant Molecular Biology*. Academic Press, NY. pp. 171.
- Schürmann P, Jacquot JP.** (2000). Plant Thioredoxin Systems Revisited. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. 51, 371-400.

**Serino G, Maliga P.** (1998). RNA polymerase subunits encoded by the plastid rpo genes are not shared with the nucleus-encoded plastid enzyme. *Plant Physiol.* 117, 1165-1170.

**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, Sugita M, Deno H, Kamogashira T, Yamada K, Kusuda J, Takaiwa F, Kato A, Tohdoh N, Shimada H, Sugiura M.** (1986). The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome: its gene organisation and expression. *EMBO J.* 5, 2043-2049.

**Shirano Y, Shimada H, Kanamaru K, Fujiwara M, Tanaka K, Takahashi H, Unno K, Sato S, Tabata S, Hayashi H, Miyake C, Yokota A, Shibata D.** (2000). Chloroplast development in *Arabidopsis thaliana* requires the nuclear-encoded transcription factor sigma B. *FEBS Lett.* 485, 178-182.

**Silhavy D, Maliga P.** (1998). Plastid promoter utilization in a rice embryogenic cell culture. *Curr Genet.* 34, 67-70.

**Silver PA, Way JC.** (1993). Eukaryotic DnaJ homologs and the specificity of Hsp70 activity. *Cell.* 74, 5-6.

**Small I, Peeters N, Legeai F, Lurin C.** (2004). Predotar: A tool for rapidly screening proteomes for N-terminal targeting sequences. *Proteomics.* 4, 1581-1590.

**Small ID, Peeters N.** (2000). The PPR motif - a TPR-related motif prevalent in plant organellar proteins. *Trends Biochem Sci.* 25, 46-57.

**Smith HJ, Bogorad L.** (1974). The polypeptide subunit structure of the DNA-dependent RNA polymerase of *Zea mays* chloroplasts. *Proc Natl Acad Sci USA.* 71, 4839-4842.

**Sonnhammer EL, Eddy SR, Durbin R.** (1997). Pfam: a comprehensive database of protein domain families based on seed alignments. *Proteins.* 28, 405-420.

**Sriraman P, Silhavy D, Maliga P.** (1998). The phage-type PcpP-53 plastid promoter comprises sequences downstream of the transcription initiation site. *Nucleic Acids Res.* 26, 4874-4879.

**Stauber EJ, Fink A, Markert C, Kruse O, Johanningmeier U, Hippler M.** (2003). Proteomics of *Chlamydomonas reinhardtii* Light-Harvesting Proteins. *Eukaryotic Cell.* 5, 978-994.

**Stegemann S, Hartmann S, Ruf S, Bock R.** (2003). High-frequency gene transfer from the chloroplast genome to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100, 8828-8833.

**Subramanian AR.** (1983). Structure and functions of ribosomal protein S1. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 28, 101-142.

- Suck R, Zeltz P, Falk J, Acker A, Kossel H, Krupinska K.** (1996). Transcriptionally active chromosomes (TACs) of barley chloroplasts contain the alpha-subunit of plastome-encoded RNA polymerase. *Curr Genet.* 30, 515-521.
- Sugita M, Sugiura M.** (1996). Regulation of gene expression in chloroplasts of higher plants. *Plant Mol Biol.* 32, 315-326.
- Sugiura M.** (1992). The chloroplast genome. *Plant Mol Biol.* 19, 149-168.
- Summer H, Pfanschmidt T, Link G.** (2000). Transcripts and sequence elements suggest differential promoter usage within the *ycf3-psaAB* gene cluster on mustard (*Sinapis alba L.*) chloroplast DNA. *Curr Genet.* 37, 45-52.
- Surpin M, Chory J.** (1997). The co-ordination of nuclear and organellar genome expression in eukaryotic cells. *Essays Biochem.* 32, 113-125.
- Tan S, Troxler RF.** (1999). Characterization of two chloroplast RNA polymerase sigma factors from *Zea mays*: photoregulation and differential expression. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96, 5316-5321.
- Tiller K, Eisermann A, Link G.** (1991). The chloroplast transcription apparatus from mustard (*Sinapis alba L.*). Evidence for three different transcription factors which resemble bacterial sigma factors. *Eur J Biochem.* 198, 93-99.
- Timmis JN, Ayliffe MA, Huang CY, Martin W.** (2004). Endosymbiotic gene transfer: organelle genomes forge eukaryotic chromosomes. *Nat Rev Genet.* 5, 123-135.
- Toro N.** (2003). Bacteria and Archaea group II introns: additional mobile genetic elements in the environment. *Environ. Microbiol.* 5, 143-151.
- Vaistij FE, Boudreau E, Lemaire SD, Goldschmidt-Clermont M, Rochaix JD.** (2000). Characterization of Mbb1, a nucleus-encoded tetratricopeptide-like repeat protein required for expression of the chloroplast *psbB/psbT/psbH* gene cluster in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97, 14813-14818.
- Wang SL, Liu XQ.** (1991). The plastid genome of *Cryptomonas phi* encodes an hsp70-like protein, a histone-like protein, and an acyl carrier protein. *Proc Natl Acad Sci USA.* 88, 10783-10787.
- Weihe A, Hedtke B, Börner T.** (1997). Cloning and characterization of a cDNA encoding a bacteriophage-type RNA polymerase from the higher plant *Chenopodium album*. *Nucleic Acids Res.* 25, 2319-2325.
- Westphal S, Heins L, Soll J, Voithknecht UC.** (2001). *Vipp1* deletion mutant of *Synechocystis*: A connection between bacterial phage shock and thylakoid biogenesis? *Proc Natl Acad Sci USA.* 98, 4238-4242.

**Wigley DB, Davies GJ, Dodson EJ, Maxwell A, Dodson G.** (1991). Crystal structure of an N-terminal fragment of the DNA gyrase B protein. *Nature*. 351, 624-629.

**Wollman FA, Minai L, Nechushtai R.** (1999). The biogenesis and assembly of photosynthetic proteins in thylakoid membranes. *Biochim Biophys Acta*. 1411, 21-85.

**Wollman FA, Kuras R, Choquet Y.** (1995). Epistatic effects in thylakoid protein synthesis: the example of cytochrome f. In: *Photosynthesis: from Light to Biosphere* (Mathis, P. ed.) Dordrecht: Kluwer Academic Publisher pp. 737-742.

**Yamazaki H, Tasaka M, Shikanai T.** (2004). PPR motifs of the nucleus-encoded factor, PGR3, function in the selective and distinct steps of chloroplast gene expression in *Arabidopsis*. *Plant J*. 38, 152-163.

**Young DA, Allen RL, Harvey AJ, Lonsdale DM.** (1998). Characterization of a gene encoding a single-subunit bacteriophage-type RNA polymerase from maize which is alternatively spliced. *Mol. Gen. Genet*. 260, 30-37.

**Yurina NP, Belkina GG, Karapetyan NV, Odintsova MS.** (1995). Nucleoids of pea chloroplasts: Microscopic and chemical characterization. Occurrence of histone-like proteins. *Biochem. Mol. Biol. Int*. 36, 145-154.

**Zerges W, Rochaix JD.** (1994). The 5' leader of a chloroplast mRNA mediates the translational requirements for two nucleus-encoded functions in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol Cell Biol*. 14, 5268-5277.

**Zhang FL, Casey PJ.** (1996). Influence of metal ions on substrate binding and catalytic activity of mammalian protein geranylgeranyltransferase type-I. *Biochem J*. 320, 925-932.

**Zhang Z, Quick MK, Kanelakis KC, Gijzen M, Krishna P.** (2003). Characterization of a plant homolog of hop, a cochaperone of hsp90. *Plant Physiol*. 131, 525-535.

**Zubko MK, Day A.** (2002). Differential regulation of genes transcribed by nucleus-encoded plastid RNA polymerase, and DNA amplification, within ribosome-deficient plastids in stable phenocopies of cereal albino mutants. *Mol Genet Genomics*. 267, 27-37.

## Danksagung

Meinem Betreuer Prof. Ralf Oelmüller danke ich herzlich für die Überlassung des interessanten Themas, die fachliche Beratung und die gewährte Freiheit bei der Durchführung und Erstellung dieser Arbeit am Institut für Allgemeine Botanik der Friedrich-Schiller-Universität Jena, Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie.

Auf gleicher Weise bedanke ich mich bei PD Dr. Thomas Pfannschmidt für seinen vielseitigen fachlichen Rat sowie für die freundliche Übernahme des Koreferats.

Der gesamten Arbeitsgruppe des Institutes möchte ich herzlich für die freundliche Arbeitsatmosphäre, zahlreichen Diskussionen und experimentellen Ratschläge danken. In besonderem Maße danke ich Staver Bazhani für seine tatkräftigen Hilfen im Labor.

Dankbar anerkennen möchte ich die Arbeiten von Barbara Bratfisch, Meta Brost, Gabi Lenk und Heide Becker bei der Versorgung und Bewältigung des Pflanzenmaterials.

Des weiteren danke ich allen anderen, die mich mit Tipps und interessanten Ideen versorgt haben. Ganz besonderer Dank geht dabei an Einar Stauber und Christine Markert für ihre intensive Einführung in die Methoden der Massenspektrometrie.

Den ehemaligen und derzeitigen Mitarbeitern des Institutes danke ich für die geistigen Aufmunterungen, die kulinarischen Versorgungen sowie zahlreichen innovativen Abenteuer außerhalb des universitären Bereiches.

Herrn Dr. Wolfgang Fischer (Institut für Allgemeine Botanik, Friedrich-Schiller-Universität Jena) danke ich für die elektronenmikroskopischen Arbeiten.

Bei Frau Dr. Andrea Kandlbinder (Universität Bielefeld, Lehrstuhl für Biochemie und Physiologie der Pflanzen) möchte ich mich für die Durchführung der *Macroarray*-Analysen bedanken.

## Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter der Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe. Es wurde weder die Hilfe eines Promotionsberaters noch die Hilfe Dritter, nicht in dieser Arbeit erwähnter Personen, in Anspruch genommen. Diese Arbeit wurde weder in dieser noch in ähnlicher Form bei einer anderen Hochschule als Dissertation oder Prüfungsarbeit eingereicht.

Jena, den 07.10.02

Jeannette Pfalz

## Curriculum Vitae

### Persönliche Daten:

Name: Jeannette Pfalz  
Hausanschrift: Herder Str. 32, 07743 Jena  
Institut: Institut für Allg. Botanik, Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie  
E-mail: b7pfje@rz.uni-jena.de  
Geburtstag/-ort: 03.01.04 in Dresden

### Schullaufbahn:

1980 - 1990 Polytechnische Oberschule „Gottfried Semper“ in Dresden  
1990 - 1991 Erweiterte Oberschule „Friedrich Engels“ in Dresden  
1991 - 1992 Erweiterte Oberschule Dresden-Plauen  
26.06.1992 Abitur

### Studium:

Okt. 1993 – Aug. 1995 Diplom-Biologie an der FSU-Jena  
Sep. 1995 – Aug. 1996 Diplom-Biologie an der Staatl. Universität St. Petersburg  
Okt. 1996 – Apr. 1999 Diplom-Biologie an der FSU-Jena  
Mai 1999 – Apr. 2000 Diplomarbeit bei Prof. Oelmüller am Institut für Allg. Botanik,  
Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie  
Thema: „Transkription von plastidenkodierten Genen am  
Beispiel von psaK und sigA“  
seit Aug. 2000 Promotion bei Prof. Oelmüller am Institut für Allg. Botanik,  
Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie  
Thema: „Identifizierung und Charakterisierung von Komponenten im  
transkriptionsaktive Chromosom (TAC)“

Jena, den 07.10.04

## **Wissenschaftliche Präsentationen**

### Vorträge:

Jeannette Pfalz and Ralf Oelmüller. (2004). Identification of Proteins in the Purified Fraction of the Transcriptionally Active chromosome (TAC). The 9th International Colloquium on Endocytobiology and Symbiosis. Jena, Germany.

Jeannette Pfalz and Ralf Oelmüller. (2004). Identification of a novel component of the Transcriptionally Active Chromosome (TAC). The Middle East Meeting. Jena, Germany.

### Poster auf Tagungen:

Jeannette Pfalz und Ralf Oelmüller. (2004). Identifizierung eines neuen essentiellen Proteins aus der TAC-Fraktion. 17. Molekularbiologische Tagung der Pflanzen. Dabringhausen, Germany.

Jeannette Pfalz and Ralf Oelmüller: Identification of New Components in the Purified Fraction of the Transcriptionally Active Chromosome (TAC). Botanikertagung in Braunschweig, Germany.

### Veröffentlichungen:

Jeannette Pfalz, Andrea Kandlbinder, Karl-Josef Dietz und Ralf Oelmüller. The plastid components pTAC2, -6 and -12 of the transcriptional active chromosome are essential for plastid gene expression. Zur Veröffentlichung eingereicht.