

mRNA-Abbau in Chloroplasten höherer Pflanzen: Mechanismus und Kontrolle

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Martin Horlitz
aus Duisburg

Düsseldorf
2000

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Der Text dieser Dissertation ist über die Internet-Seiten der Universitätsbibliothek
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf elektronisch abrufbar:

<http://www.ulb.uni-duesseldorf.de/diss/mathnat/2000/horlitz.html>

Referent: Univ.-Prof. Dr. Detlev Riesner

1. Koreferent: Univ.-Prof. Dr. Peter Westhoff

2. Koreferentin: Priv.-Doz. Dr. Petra Klaff

Danksagung

Mein Dank gilt zuerst Herrn Prof. Dr. Detlev Riesner, unter dessen Leitung diese Arbeit angefertigt wurde, für sein Interesse am Fortgang meiner Arbeit und für fruchtbare Diskussionen.

Meiner Betreuerin, Frau Priv.-Doz. Dr. Petra Klaff gebührt mein außerordentlicher Dank für eine kompetente und engagierte Begleitung meiner wissenschaftlichen Arbeiten. Besonders danke ich für ihre kritische Solidarität, die mir auch in schwierigeren Phasen der Erarbeitung dieser Dissertation den Rücken gestärkt hat. Ich konnte auf diese Weise meinen eigenen Arbeitsstil erproben und entwickeln, was nach meiner Überzeugung von besonderem Wert ist.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Peter Westhoff für die Bereitschaft, meine Arbeit als Ko-Korrektor zu begutachten.

Ferner bedanke ich mich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Physikalische Biologie für die gute, freundliche Arbeitsatmosphäre. Mein besonderer Dank gilt jedoch der „RNA-Stabilitäts-Crew“ (oder: „Raum 41&43“), für ein von *Common Sense* getragenes ausgesprochen gutes Arbeitsklima. — Namentlich seien erwähnt (chronologisch): Elke Reinartz, Nadja Faber, Katja Aschermann, Stephan Kuhlmann, Thomas Töller, Dr. Christiane Saddig, Markus Pattschull, Thyra Parthen und Andrea Eicker.

Herrn Prof. Dr. John A. S. McGuigan und Frau Dr. Dorothee Günzel schulde ich vielfachen Dank für eine fundierte und engagierte Einführung in die Geheimnisse der potentiometrischen Magnesiumbestimmungen, Herrn Prof. McGuigan danke ich darüber hinaus für die Überlassung von Magnesiumelektroden und Meßgeräten.

Meinem Bruder Jörg Horlitz danke ich für zahllose (Not-)Hilfen bei diversen Rechner-Problemen und eine Einführung in die Geheimnisse von Linux, $\text{\LaTeX}$ und $\text{\LyX}$, ohne die es diese Arbeit in dieser Form wohl kaum gegeben hätte.

Last but not least danke ich Andreas Magunski für die Hilfe beim Korrekturlesen der „finalen Version“ dieser Dissertation.



JOHANN SEBASTIAN BACH (1685-1750)

Anfang des sechsstimmigen Ricercars aus dem Musikalischen Opfer (BWV 1079)¹

¹ entnommen aus: „Johann Sebastian Bach / Seine Handschrift — Abbild seines Schaffens“ Alfred Dürr, Hrsg. – Breitkopf & Härtel, Wiesbaden (1984)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Chloroplasten	1
1.2	Genexpression in Chloroplasten	2
1.2.1	Genom und Transkription	2
1.2.2	mRNA-Prozessierung & mRNA-Stabilität	4
1.2.3	Translation	6
1.3	RNA-Abbaumechanismen	7
1.3.1	Chloroplasten	7
1.3.2	Prokaryonten	10
1.4	Detailansicht	11
1.4.1	Die <i>psbA</i> -mRNA wird während der Chloroplastenreifung stabilisiert .	11
1.4.2	Modelle zur Regulation der Stabilität der <i>psbA</i> -mRNA	12
1.5	Problemstellung	14
	mRNA-Stabilität in Chloroplasten <i>in vivo</i>	14
	Konservierte mRNA-Sekundärstrukturen <i>in silico</i>	15
	Regulation des <i>psbA</i> -mRNA-Abbaus I: <i>cis</i> -Elemente	15
	Regulation des <i>psbA</i> -mRNA-Abbaus II: <i>trans</i> -Faktoren	15
2	Material	16
2.1	Standard-Chemikalien und -Lösungen	16
2.1.1	Allgemeines	16
2.1.2	Häufig verwendete Puffer und Lösungen	16

2.2	Spezielle Materialien	17
2.2.1	Pflanzen	17
2.2.2	Nukleinsäuren	18
	Chloroplasten-DNA aus Spinat	18
	DNA-Oligonukleotide	18
3	Methoden	19
3.1	Cytologische Methoden	19
3.1.1	Isolierung von Chloroplasten / Präparation lysierter Chloroplasten . .	19
3.1.2	Konzentrationsbestimmung von Chloroplastenextrakten	20
	Proteinbestimmung nach Bradford	20
	Chlorophyllbestimmung	21
3.1.3	Fraktionierung von Chloroplasten zur Mg^{2+} -Bestimmung	21
3.1.4	Bestimmungen der Konzentration von freien Mg^{2+} -Ionen in Chloroplastenextrakten	21
3.1.5	Größenbestimmung von Chloroplasten	22
3.2	Molekularbiologische Methoden	22
3.2.1	Nukleinsäure-Fällungen	22
	Natriumacetat/Ethanol-Fällung	22
	Natriumacetat/Isopropanol-Fällung	23
3.2.2	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	23
3.2.3	Präparation von Gesamt-RNA aus Pflanzen	23
	A. Präparation von Gesamt-RNA aus Tabak- und <i>Arabidopsis</i> -Blättern	23
3.2.4	Biochemische Synthese von Nukleinsäuren	26
	Herstellung von <i>in-vitro</i> -Transkripten	26
	Herstellung von teilweise doppelsträngigen <i>in-vitro</i> -Transkripten . . .	28
	RNase-Schutz-Experimente	28
	5'-Endmarkierung von Oligonukleotiden mit ^{32}P	28
3.2.5	Gelelektrophoresen	29
	Leistungsgesteuerte Polyacrylamid-Gelelektrophorese	29

	Silberfärbung von Polyacrylamidgelen	30
	Denaturierende Agarosegelelektrophorese	31
	Ethidiumbromidfärbung	31
3.2.6	Northern-Analyse	32
	Kapillartransfer von RNA (Northern-Transfer)	32
	Hybridisierung mit ^{32}P -markierten Oligonukleotid-Sonden	32
	Entfernen gebundener Oligonukleotid-Sonden	33
3.2.7	Autoradiographien	33
	Quantifizierung von Autoradiographiesignalen	33
3.3	RNA-Zerfallsexperimente	34
3.3.1	mRNA-Abbau <i>in vivo</i>	34
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	34
	<i>Nicotiana tabacum</i>	34
3.3.2	mRNA-Abbau <i>in organello</i>	35
3.3.3	<i>in-vitro</i> -RNA-Zerfallsystem	35
3.4	Computer-Simulationen	35
3.4.1	Vorhersage konservierter RNA-Sekundärstruktur	35
4	Ergebnisse	38
4.1	Plastidäre RNA-Stabilität	38
4.1.1	Voraussetzungen und Grundlagen	38
	Northern-Analysen und untersuchte mRNAs	39
	Annahmen zur Kinetik des mRNA-Abbaus	40
4.1.2	Plastidäre mRNA-Stabilität in Tabak	41
4.1.3	Plastidäre mRNA-Stabilität in <i>Arabidopsis</i>	45
4.1.4	mRNA-Halbwertszeiten <i>in vivo</i> in Chloroplasten von Tabak und <i>Ara-</i> <i>bidopsis</i>	48
4.2	Konservierte RNA-Sekundärstrukturen	49
4.2.1	Betrachtete mRNAs und verwendete Sequenzen	49
4.2.2	CONSTRUCT-Rechnungen: Wahl der Parameter	50

4.2.3	Konservierte Sekundärstrukturen der <i>psbA</i> -mRNA	51
4.2.4	Konservierte Strukturelemente der <i>rbcL</i> -mRNA	54
4.2.5	Zusammenfassung der Strukturberechnungen	61
4.3	RNA-Abbaumechanismus	64
4.3.1	Prinzip der Analyse von mRNA-Abbau mittels hochauflösendem Nachweis von Degradationsfragmenten	64
4.3.2	Intakte und lysierte Chloroplasten: Abbau der endogenen <i>psbA</i> -mRNA Abbau exogener <i>psbA in vitro</i> -Transkripte	66 69
4.3.3	Ergebnisse zum Mechanismus des <i>psbA</i> -mRNA-Abbaus	73
4.4	Magnesium & RNA-Stabilität	73
4.4.1	Stabilisierung plastidärer RNAs in Gegenwart von Mg^{2+}	74
4.4.2	Titration der RNA-Stabilität mit Mg^{2+}	74
4.4.3	Konzentrationen von freiem Mg^{2+} in RNA-Zerfallstitrationen	76
4.4.4	Magnesium-abhängige RNA-Stabilisierungsprofile	78
4.5	Magnesium & RNA-Degradationsmuster	81
4.5.1	Mg^{2+} -abhängige Degradationsmuster der <i>psbA</i> -mRNA <i>in vitro</i>	82
4.5.2	Degradationsmuster der <i>psbA</i> -mRNA in der Stabilitätstitration	84
4.6	Biologische Bedeutung	86
5	Diskussion	89
5.1	RNA-Metabolismus in Chloroplasten	90
5.2	Mechanismus des RNA-Abbaus	92
5.3	Konservierte RNA-Strukturen	94
5.4	Magnesium-induzierte RNA-Stabilisierung	96
5.5	Ausblick	100
6	Zusammenfassung	102

7	Dokumentationen	104
7.1	DNA-Oligonukleotide	105
7.1.1	Oligonukleotid-Sonden für Northern-Analysen	105
7.1.2	Primer zur PCR-Herstellung von Transkriptionsmatrizen	106
7.2	Dotplot-Darstellungen	107
7.3	Alignments	112
8	Abkürzungen	131

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Chloroplasten

Chloroplasten sind semiautonome Zellorganellen, die bei allen eukaryontischen photoautotrophen Organismen, d. h. bei Algen und höheren Pflanzen, vorkommen. Die wichtigste biochemische Leistung dieser Organellen besteht in den Photosynthese-Reaktionen, die den pflanzlichen Organismus mit der notwendigen chemischen Energie versorgen. Man bezeichnet Chloroplasten als „semiautonom“, da sie innerhalb der Pflanzenzelle eine begrenzte genetische Eigenständigkeit besitzen: Sie verfügen über ein eigenes Genom und einen eigenen Genexpressionsapparat – alle Enzymkomplexe der Chloroplasten (einschließlich der Ribosomen) sind aus kern- wie organell-kodierten Genen zusammengesetzt. Zu den besonderen Eigenschaften der Plastiden als begrenzt autonome Zellorganellen gehört auch ihre Vermehrung: Chloroplasten entstehen nicht *de novo*, sondern durch Teilung vorhandener Plastiden. In Blattprimordien liegen Plastiden als undifferenzierte Formen, sog. Proplastiden vor. Diese Proplastiden differenzieren sich parallel zur Blattentwicklung zu reifen Chloroplasten. Dabei nimmt zunächst das Plastidenvolumen zu, dann kommt es unter dem Einfluß von Licht zur Ausbildung der charakteristischen Feinstruktur des Chloroplasten, insbesondere zur Ausbreitung der Thylakoidmembranen und der Akkumulation der photosynthetischen Enzymkomplexe. Auch die Zahl der Plastiden pro Zelle steigt bei höheren Pflanzen deutlich an, bei Gerste von ca. 10 auf ca. 65 pro Zelle (Übersicht: Mullet, 1988).

Nach den Vorstellungen der Endosymbionten-Theorie geht man davon aus, daß Plastiden – wie auch Mitochondrien – als Nachfahren ehemals selbständig lebender prokaryontischer Organismen (aus der Gruppe der *Eubacteria*) anzusehen sind. Dies stützt sich u. a. auf die grundlegenden Merkmale des Genexpressionsapparates der Plastiden: Plastidäre Ribosomen gehören zum eubakteriellen 70S-Typ, das Chloroplastengenom besteht in der Regel aus einem einzigen ringförmigen DNA-Molekül, das allerdings in reifen Chloroplasten hochpolyloid vorliegt (ca. 50 Genomkopien pro Organell, während der Blattentwicklung auf bis zu 1000

Genome ansteigend). Plastidäre Promotoren zeigen Ähnlichkeiten zum bakteriellen „-35/-10“-Typ. Die Ähnlichkeit zu Eubakterien gilt auch für die plastidären tRNAs.

Proplastiden sind zwar nicht photosynthetisch aktiv, besitzen aber bereits eine basale Genexpression und spielen ebenso wie reife Plastiden eine Rolle im Aminosäure- und Lipidstoffwechsel der Pflanzenzelle. Neben der Entwicklung von Proplastiden zu Chloroplasten, die für Mesophyllgewebe charakteristisch ist, können sich Proplastiden auch zu Amyloplasten (Stärkespeicher), Leukoplasten (in Wurzeln), und Chromoplasten (in Blütenblättern) entwickeln (Kirk & Tilney-Bassett, 1978; Reinert, 1980). Proplastiden entwickeln sich in dunkel gehaltenen Pflanzen zunächst zu wenig differenzierten Etioplasten. Diese sind zwar ähnlich groß wie reife Chloroplasten, dafür aber frei von Thylakoiden und damit auch von photosynthetischen Membrankomplexen. Erst bei Belichtung kommt es zur Umwandlung in den reifen Chloroplasten. Generell sind alle Plastidentypen ineinander umwandelbar, zum Beispiel wandeln sich während der Blütenentwicklung Chloroplasten in Chromoplasten um (Sitte *et al.*, 1980).

1.2 Genexpression in Chloroplasten

1.2.1 Genom und Transkription

Genom. Die Größe des ringförmigen Chloroplastengenoms beträgt bei höheren Pflanzen ca. 120 bis 160 kb und ist ähnlich wie in Bakterien in Nukleoiden organisiert (Palmer, 1985; Sugiura, 1989; Kuroiwa, 1991). Zur Zeit sind die kompletten Sequenzen der Chloroplastengenome von sechs höheren Pflanzen bekannt (*Arabidopsis thaliana* [Sato *et al.*, 1999], *Nicotiana tabacum* [Shinozaki *et al.*, 1986], *Oenothera elata* [Hupfer, 2000], *Oryza sativa* [Hiratsuka *et al.*, 1989], *Zea mays* [Maier *et al.*, 1995] und *Pinus thunbergii* [Wakasugi *et al.*, 1994]). Die Chloroplasten-DNA der höheren Pflanzen enthält eine große invertierte Sequenzwiederholung („inverted Repeat“/IR-Region) deren Länge 6 bis 76 kb betragen kann und die eine größere einfach vorhandene Region von einer kleineren abgrenzt („large single copy region“ LSC / „small single copy region“ SSC). Die Komplexität des Chloroplastengenoms ist bei Angiospermen vergleichsweise einheitlich; physikalische Größenunterschiede des Genoms kommen im wesentlichen durch unterschiedliche Längen der IR-Regionen zustande. Pflanzen der Ordnung *Fabales* und Gymnospermen enthalten (soweit bekannt) keine IR-Regionen (Palmer, 1985; Sugiura, 1992). Der Gengehalt des Plastoms – und damit die Balance zwischen kern- und plastidenkodierten Genprodukten – ist unter den Angiospermen stark konserviert. Man findet im Plastom etwa 100 Proteingene sowie Gene für die ribosomalen RNAs und Transfer-RNAs. Funktionell lassen sich die Chloroplastengene in zwei Gruppen einteilen: rRNA- und tRNA-Gene bilden zusammen mit Genen für ribosomale Proteine sowie RNA-Polymerase-Untereinheiten eine Gruppe von Genen mit basalen Funktionen im Genexpressionsapparat

(„Haushaltsgene“), die übrigen Gene kodieren Untereinheiten der photosynthetischen Enzymkomplexe (Photosystem I & II, Cytochrom b_6f -Komplex, CF_0CF_1 -ATPase, große Untereinheit der RubisCO) oder haben keine bekannte Funktion. In höheren Pflanzen sind etwa je ein Drittel der Photosynthese-Proteine und der ribosomalen Proteine in der Chloroplasten-DNA kodiert. Sämtliche rRNAs und tRNAs des Chloroplasten sind plastom-kodiert – ein Transport von (kernkodierten) ribosomalen und Transfer-RNAs aus dem Cytosol in Chloroplasten ist bisher nicht bekannt. Ähnlich wie in Prokaryonten sind die Gene im Plastom typischerweise in Operons organisiert, die zum Teil auch im Detail noch an ihren eubakteriellen Ursprung erinnern wie z. B. das *rpl23*-Operon bei Tabak, das homolog zum S10-Operon bei *E. coli* ist (Tanaka *et al.*, 1986). Plastidäre Gene können auch Introns enthalten, so daß reife mRNA-Moleküle durch Spleißen erzeugt werden müssen (siehe Kap. 1.2.2).

Transkription. Das Chloroplastengenom wird von zwei verschiedenen RNA-Polymerasen transkribiert, von denen die eine im Chloroplastengenom kodiert ist („plastid encoded polymerase“ PEP) und die andere im Kerngenom („nuclear encoded polymerase“ NEP) (Maliga, 1998). Die kernkodierte Polymerase transkribiert Gene, die für den Genexpressionsapparat benötigt werden; die von ihr erkannten Promotoren weisen ein charakteristisches Sequenzmotiv (C-R-T) auf, das hinreichend für die Initiation ist. Nach derzeitigem Erkenntnisstand handelt es sich bei der NEP um ein einziges Polypeptid von 110 bis 113 kDa, dessen putatives Gen (*RpoZ*) in *Arabidosis* indentifiziert wurde (Hedtker *et al.*, 1997, Iratni *et al.*, 1993). Die plastidenkodierte Polymerase ist mit ihrer $\alpha_2\beta\beta'$ -Untereinheitenzusammensetzung der eubakteriellen RNA-Polymerase homolog; ihre Promotoren gehören zum eubakteriellen „-35/-10“-Typ. Man geht allerdings davon aus, daß die PEP in reifen Chloroplasten einen größeren Komplex mit zusätzlichen regulatorischen Polypeptiden ausbildet (Enzym A), während in Etioplasten ein $\alpha_2\beta\beta'$ -Core-Enzym (Enzym B) vorliegt (Pfannschmidt *et al.*, 1998). Die PEP transkribiert in erster Linie die Gene der Photosynthese-Proteine, offensichtlich werden aber viele Chloroplastengene von beiden Polymerase-Typen transkribiert (Maliga, 1998). Beide plastidären RNA-Polymerasen sind zumindest vorübergehend mit regulatorischen Proteinen, Chloroplasten- σ -Faktoren, assoziiert, die – soweit bekannt – kernkodiert sind (Oikawa *et al.*, 1998; Isono *et al.*, 1998). Generell spielt die Transkription in Chloroplasten nur eine untergeordnete Rolle bei der Genregulation, insbesondere hinsichtlich der genspezifischen entwicklungsabhängigen Regulation (Übersicht: Gruissem & Tonkyn, 1993). Dennoch dürften σ -ähnliche Faktoren u. a. eine Rolle bei der lichtabhängigen Transkriptionsregulation spielen, wie es bei *Oryza* beschrieben wurde: Der Spiegel des σ -ähnlichen Faktors „Os-sigA“ wird bei Belichtung gewebespezifisch erhöht, was dessen Mitwirkung bei der lichtinduzierten Erhöhung der Transkriptionsrate in Chloroplasten nahelegt (Tozawa *et al.*, 1998). Plastidäre Transkriptionsfaktoren können durch Phosphorylierung entwicklungsabhängig reguliert werden (Tiller & Link, 1993; Baginsky *et al.*, 1997). Prinzipiell kann die Transkriptionsrate in Chloroplasten stark variieren, in Gerste wurden Änderungen um das 300fache festgestellt (Rapp *et al.*, 1992). Generell steigt die Transkriptionsrate in jungen Chloroplasten bzw. Proplastiden während der

Reifung nach Belichtung zunächst stark an und nimmt dann im reifen Organell wieder ab, so beschrieben für Gerste (Mullet & Klein, 1992), Spinat (Deng & Gruissem, 1987) und Mais (Rodermeil 1985). Diese Änderungen der Transkriptionsrate sind – wie bereits erwähnt – eher globaler Natur und können zur Erklärung genspezifischer Regulation nicht herangezogen werden (Mayfield *et al.*, 1995). Eine Ausnahme ist z.B. das *psbC-psbD*-Operon in Gerste, das eine spezifische lichtinduzierte Erhöhung der Transkription zeigt (Christopher *et al.*, 1992; Sexton *et al.*, 1990).

1.2.2 mRNA-Prozessierung & mRNA-Stabilität

mRNA-Prozessierung. Wie in Eubakterien sind auch in Chloroplasten die meisten Gene zu Operons zusammengefaßt, die polycistronische Primärtranskripte liefern. In der Regel werden diese Prä-mRNAs durch folgende Prozessierungsreaktionen in reife mono- oder dicistronische mRNAs überführt, die den dominierenden Anteil der mRNA in Chloroplasten bilden. (Gruissem & Tonkyn, 1993). Allerdings können plastidäre mRNAs auch in polycistronischer Form effizient translatiert werden (Barkan, 1988; Staub & Maliga, 1995), für monocistronische Prozessierungsprodukte ist lediglich eine erhöhte Translationsrate diskutiert worden, die im Einzelfall eine Möglichkeit zur differentiellen Translation und damit zur differentiellen Genexpression bietet (Barkan *et al.*, 1994). Aufgrund der bisher vorliegenden Befunde kommt der Reifung polycistronischer Primärtranskripte keine allgemeine entscheidende Bedeutung in der differentiellen Genexpression zu (Übersicht: Mayfield *et al.*, 1995).

Eine Reihe plastidärer Gene enthält Introns, die während der Transkriptreifung entfernt werden. Die Introns können sowohl der Gruppe I angehören, bei denen das Spleißen durch einen aktiviertes Guanodin-Nukleotid initiiert wird (Angriff auf die 5'-Spleißstelle zum Lösen der Phosphodiesterbindung), als auch der Gruppe II; hierbei wird das Spleißen durch ein aktiviertes Adenin eingeleitet, das nach Angriff an der 5'-Spleißstelle ein charakteristisches Lasso-Intermediat bildet (Somanchi & Mayfield, 1999). Die Kenntnisse über die plastidäre Spleißmaschinerie sind noch begrenzt, die Analyse von nukleären Mutanten in *Chlamydomonas* (*ac20*) und Mais (*crs1*, *crs2*) hat jedoch ergeben, daß zumindest die Schlüsselfaktoren des Spleißapparates im Zellkern kodiert sind und unmittelbar am Spleißvorgang mitwirken (Herin *et al.*, 1997; Fisk *et al.*, 1999; Jenkins *et al.*, 1999). Trans-Spleißen ist ein sehr komplexes Phänomen, das auch in Chloroplasten vorkommt (*rps12* in höheren Pflanzen, *psaA* in *Chlamydomonas*). Das *psaA*-Gen in *Chlamydomonas* ist in drei Teilen über das Genom verteilt, die verschiedenen Operons angehören. Um die zum Spleißen von Gruppe-II-Introns notwendige Struktur auszubilden, wird eine weitere plastidäre RNA (*tscA*) benötigt (Goldschmidt-Clermont *et al.*, 1991). Nukleäre Gene sind an den Vorgängen des Trans-Spleißens beteiligt (Goldschmidt-Clermont *et al.*, 1990).

Neben der Entfernung von Introns werden reifende Prä-mRNAs auch am 5'- und 3'-Ende durch Nukleasen prozessiert. Die *psbA*-mRNA von *Chlamydomonas* wird am 5'-Ende durch

einen endonukleolytischen Schnitt um 54 nt verkürzt, dabei wird eine Haarnadel-Sekundärstruktur abgeschnitten (Bruick & Mayfield, 1998). Dieses Prozessierungsereignis erfordert die aktive Translation, da Hemmung der Translation zum Verlust der Prozessierung führt. Dieser Hinweis auf eine enge funktionelle Verbindung von RNA-Prozessierung und Translation wird auch durch den Befund unterstützt, daß mRNA-bindende Proteine des Chloroplasten sowohl an reife mRNA als auch an die noch unprozessierten Vorläufer-RNAs binden (Nakamura *et al.*, 1999). Die Prozessierung des 3'-Endes wird auf RNA-Ebene durch Haarnadelstrukturen vermittelt, die sich aufgrund selbstkomplementärer Sequenzmotive ausbilden. Ihre Funktion bei der mRNA-Prozessierung wird als Barriere gegen den 3'→5'-exonukleolytischen Abbau postuliert (Stern & Gruissem, 1987; Adams & Stern, 1990; Stern *et al.*, 1991; Rott *et al.*, 1998).

Einige mRNAs werden Editing-Prozessen unterzogen (Hoch *et al.* 1991, Kudla *et al.* 1992). Dies ist insbesondere dann bedeutsam, wenn erst durch RNA-Editing Initiatorcodons für die Translation erzeugt werden (*rpl2* in Mais, *psbL* in Spinat und Tabak). Im Falle des *psbF-psbL*-Transkriptes in Tabak wird differentielle Genexpression durch Editing vermittelt: In Samen und Wurzeln wird das Editing unterdrückt, so daß *psbL* nicht translatiert werden kann (Bock *et al.*, 1993). Aufgrund neuerer Untersuchungen scheint plastidäres RNA-Editing nicht ohne plastidäre Translation auszukommen, man vermutet daher, daß im Chloroplastengenom wie im Zellkern plastidäre Editingfaktoren kodiert werden (Bock & Koop, 1997; Karcher & Bock, 1998).

mRNA-Stabilität. Während der Blattentwicklung kommt es in den Chloroplasten zu einer auffälligen differentiellen Akkumulation von mRNAs. Gleichzeitig nehmen die entsprechenden Transkriptionsraten ab, ohne daß in jedem Fall ein quantitativer Zusammenhang zwischen Transkriptionsrate und mRNA-Akkumulation festgestellt werden konnte (Rapp *et al.*, 1992). So ist in dunkel herangezogenen Kotyledonen die *rbcL*-mRNA 7 – 10fach höher konzentriert als die *psbA*-mRNA, obwohl das *psbA*-Gen eine höhere Transkriptionsrate besitzt. Nach Belichtung erreicht der *psbA*-mRNA-Spiegel den von *rbcL*, wobei sich die jeweiligen Transkriptionsraten nicht ändern (Gruissem *et al.* 1988). Direkte mRNA-Zerfallsuntersuchungen *in vivo* bestätigten die Rolle der mRNA-Stabilität für die differentielle mRNA-Akkumulation: in Spinat nimmt die Halbwertszeit der *psbA*-mRNA in Verlauf der Blattentwicklung von 4 – 5 h auf über 10 h zu, während die Halbwertszeit der *rbcL*-mRNA bei 4 – 5 h konstant bleibt (Klauff & Gruissem, 1991). In Gerste werden die Stabilitäten plastidärer mRNAs während der Chloroplastenentwicklung in unterschiedlichem Maße verändert, beispielsweise bleibt die Halbwertszeit der *atpB*-mRNA bei ca. 8 h konstant, während sich bei der *psbA*-mRNA die Halbwertszeit von 8 h auf über 40 h erhöht (Kim *et al.*, 1993). Plastidäre mRNAs sind also erheblich stabiler als bakterielle Transkripte, deren Halbwertszeiten im Bereich von Sekunden bis Minuten liegen (siehe Kap. 1.3.2). Für die *rbcL*-mRNA ist in Mesophyll- und Bündelscheidenzellen des Fuchsschwanzes (*Amaranthus*) eine zellspezifische Regulation der

mRNA-Stabilität vorgeschlagen worden (Boinski *et al.*, 1993).

Am Beispiel der *psaA*-mRNA in Spinat wurde eine Abhängigkeit der mRNA-Stabilität von der Lichtqualität nachgewiesen (Deng *et al.*, 1989). Pflanzen, die unter Rotlicht wachsen, das vorwiegend vom Photosystem I absorbiert wird, zeigen deutlich (5 – 15fach) reduzierte Spiegel speziell der *psaA*-mRNA – diese codiert das P700-Chlorophyll-a-Apoprotein A1 im Photosystem I. Dieser Effekt ist durch die nur geringfügig reduzierte Transkriptionsrate nicht zu erklären: Hier liegt offenbar eine spezifische durch intensives Rotlicht induzierte Destabilisierung der *psaA*-mRNA vor.

Neben den genannten Faktoren spielt auch die Translation bzw. Ribosomenbindung einer mRNA eine wichtige Rolle für ihre Stabilität: Analysen von nukleären Mutanten in *Chlamydomonas* (Kuchka *et al.*, 1989) und Mais (Barkan 1993) ergaben, daß die Bindung von Ribosomen – ähnlich wie bei Bakterien – die mRNA stabilisiert. Untersuchungen an Spinatblättern unter *in-vivo*-Bedingungen zeigten jedoch, daß die Behandlung mit Chloramphenicol, das die mRNAs in einen polysomenassoziierten Zustand zwingt, zu beschleunigtem Zerfall der *psbA*- und *rbcL*-mRNA führt; Lincomycin, welches die Assoziation in Polysomen, nicht aber die Initiation verhindert, hat eine stabilisierende Wirkung auf die *psbA*- und *rbcL*-mRNA (Klaff & Gruissem 1991). Ähnliches konnte zuvor in *Chlamydomonas* gezeigt werden (Spreitzer *et al.* 1985): Plastidäre nonsense-Mutanten, die zu vorzeitigem Abbruch der Translation führen, lassen die betroffene mRNA unverhältnismäßig stark akkumulieren, ohne daß sich die Transkriptionsrate erhöht. Diese Befunde machen deutlich, daß Translation bzw. Ribosomenbindung eine erhebliche Wirkung auf die plastidäre mRNA-Stabilität in Grünalgen und höheren Pflanzen ausüben.

1.2.3 Translation

Reife funktionelle mRNAs in Chloroplasten besitzen keine Cap-Strukturen oder Poly(A)-Reste wie reife cytosolische mRNAs. Poly(A)-reiche Sequenzen, die in bestimmten plastidären mRNA-Spezies gefunden wurden, sind offenbar Signale für den schnellen exonukleolytischen Abbau dieser mRNAs (siehe Kap. 1.3.1). Plastidäre Transkripte besitzen ein 5'-Triphosphat, sofern das reife 5'-Ende nicht durch Prozessierung erzeugt wurde. Bei der Translationsregulation stellen Chloroplasten eine Zwischenform von Pro- und Eukaryonten dar. Die grundlegende Translationsmaschinerie zeigt weitgehend prokaryontische Eigenschaften (70S-Ribosomen), darüberhinaus wurden aber auch regulatorische Komponenten der – eukaryontischen – Wirtszelle in den Chloroplasten integriert (Übersicht: Sugiura *et al.*, 1998; Bruick & Mayfield, 1999). In Chloroplasten können manche polycistronische mRNAs sowohl als reife mono- oder dicistronische Transkripte, wie auch als unprozessierte mRNA translatiert werden; dabei ist die Translation der reifen mRNA-Form deutlich effizienter. Dies wurde anhand der mRNA des *psbB*-Operons bei Mais gezeigt (Barkan, 1988; Barkan *et al.*, 1994). Während in *E. coli*

nahezu alle mRNAs SHINE-DALGARNO-Sequenzen als Ribosomen-Bindestellen in einem konservierten Abstand von 7 ± 2 nt stromaufwärts des Startcodons besitzen (Shine & Dalgarno, 1974; McCarthy & Brimacombe, 1994), so ist die Situation in Chloroplasten deutlich anders: Etwa bei einem Drittel der Protein-Leserahmen fehlt diese Signalsequenz ganz, bei anderen findet sich eine SHINE-DALGARNO-ähnliche Sequenz, aber nicht einem konservierten Abstand zum Translations-Startcodon (Ruf & Kössel, 1988; Bonham-Smith & Bourque, 1989; Sugiura *et al.*, 1998).

Bei der Regulation der Translation spielt die 5'-untranslatierte Region der mRNA eine entscheidende Rolle (Sakamoto *et al.*, 1993). Kernkodierte plastidäre Proteine, die an diese Region der mRNA binden, kommen als Regulatoren der Translation in Frage (Hotchkiss *et al.*, 1999, Klaff & Gruissem, 1995). In Spinat wurde ein Protein, das an die 5'-untranslatierte Region der *psbA*-mRNA bindet, als das ribosomale Protein S1 indentifiziert (Alexander *et al.*, 1998) - ein starker Hinweis auf eine Mitwirkung der 5'-untranslatierten Region bei der Translationsregulation. In *Chlamydomonas* konnte gezeigt werden, daß neben der 5'- auch die 3'-untranslatierte Region der mRNA an der Translationsregulation mitwirkt; hier ist offenbar korrekte Prozessierung beider Enden der mRNA für deren Translation notwendig (Rott *et al.*, 1998, Bruick & Mayfield, 1998). Die – streng lichtabhängige – Translation der *psbA*-mRNA wird u. a. durch den Oxidationsstatus infolge des Elektronenflusses über die Photosysteme gesteuert (Danon & Mayfield, 1994a). Dabei werden Translationsfaktoren offenbar über Phosphorylierungs-/Dephosphorylierungszyklen reguliert – dies führt bei Belichtung über die Reduktion von Thioredoxin zum Einschalten der Translation der *psbA*-mRNA (Danon & Mayfield, 1994b). Neuere Arbeiten an Mais weisen auf einen weiteren Mechanismus der licht-abhängigen Translationsregulation hin: Die Subpopulationen der ribosomalen Proteine L2, L21 und L29 in reifen Ribosomen verändern sich relativ zueinander im Verlauf der Chloroplastenreifung nach Belichtung etiolierter Keimlinge, d. h. es kommt zur entwicklungsabhängigen Änderung der Proteinzusammensetzung der Ribosomen (Zhao *et al.*, 1999). Inwieweit dieses Phänomen eine Bedeutung bei der Translationsregulation hat, ist allerdings noch unklar.

1.3 Mechanismen des mRNA-Abbaus

1.3.1 Chloroplasten

Die Regulation der mRNA-Stabilität ist in Chloroplasten die entscheidende Stufe der Genregulation, die im Verlauf der Plastidenentwicklung genspezifisch die Akumulation von mRNAs steuert. Die biochemischen Abläufe, die zum Abbau einer mRNA führen, fügen sich erst allmählich zu einem Bild zusammen. Dabei gibt es offenbar Unterschiede zwischen Chloroplasten aus Algen (insbesondere *Chlamydomonas*) und höheren Pflanzen (Übersicht: Schuster

et al., 1999).

Bei der Analyse des mRNA-Metabolismus in *Chlamydomonas* stehen charakteristische Mutanten mit Defekten in *trans*-regulatorischen Faktoren sowie *cis*-regulatorischen Elementen zur Verfügung. Die nukleäre Mutante *nac2-26* zeigt als Phänotyp eine reduzierte Stabilität der *psbD*-mRNA. Der Einsatz von Reportergenkonstrukten ergab, daß die Empfindlichkeit der *psbD*-mRNA für die *nac2-26*-vermittelte Destabilisierung auf die 5'-untranslatierte Region zurückgeht. Tatsächlich bindet in Wildtyp-Zellen ein 47 kDa-Protein an die 5'-untranslatierte Region der *psbD*-mRNA, welches in der Mutante fehlt. Somit ist dieses Protein ein Kandidat für einen genspezifischen kernkodierten Faktor, der eine plastidäre mRNA stabilisiert (Nickelsen *et al.*, 1994; Nickelsen *et al.*, 1999). Ein weiteres Beispiel ist die Regulation der Stabilität der *petD*-mRNA in *Chlamydomonas*. Hier wirken Sequenzen in der 5'-untranslatierten Region *cis*-regulatorisch sowohl auf die RNA-Stabilität als auch auf die Translationseffizienz, wobei die Translation offenbar auf die mRNA-Stabilität zurückwirkt (Sakamoto *et al.*, 1994). Auch hier konnte eine entsprechende Kernmutante (F16, eine Mutante im Genlocus *mcd1-1*) gefunden werden, die spezifisch die Stabilität der *petD*-mRNA beeinflusst. Offenbar ist das Genprodukt von *mcd1-1* an der Bindung von Proteinen an die 5'-untranslatierte Region beteiligt, die Schutz gegen 5'→3'-exonukleolytischen Abbau vermitteln (Drager *et al.*, 1998). In höheren Pflanzen gibt es bisher keine direkten, wohl aber indirekte Hinweise auf die Bedeutung der 5'-untranslatierten Region bei der differentiellen Regulation der mRNA-Stabilität. In Mais-Mutanten, bei denen die Ribosomenbindung an die *rbcL*-mRNA gestört ist, ist der mRNA-Spiegel auf ein Viertel reduziert, sodaß auf eine Wirkung der Polysomenassoziation auf die mRNA-Stabilität geschlossen werden kann (Barkan, 1993). Für dieselbe mRNA gibt es in Tabak indirekte Hinweise darauf, daß die RNA-Stabilität über die 5'-untranslatierte Region vermittelt wird (Shiina *et al.*, 1998; Eibl *et al.*, 1999). Die 5'- und 3'-untranslatierten Regionen plastidärer mRNAs (*psbA*, *rbcL*, *rpl32*) beeinflussen generell sowohl die Stabilität als auch die Translationseffizienz der mRNA (Eibl *et al.*, 1999). Für die *psbA*-mRNA konnte in Spinat gezeigt werden, daß der endonukleolytische Abbau der mRNA durch in 5'→3'-Richtung fortschreitende Schnitte erfolgt (Klauff, 1995).

Neben der 5'-untranslatierten Region ist auch die 3'-untranslatierte Region für die Akkumulation einer plastidären mRNA von zentraler Bedeutung. Die meisten mRNAs enthalten in der 3'-untranslatierten Region putative Haarnadelstrukturen, die als Signale für die 3'-End-Prozessierung dienen. Offensichtlich wirken diese Strukturelemente aber nicht nur bei der Prozessierung, sondern vermitteln auch Schutz gegenüber dem Angriff von 3'→5'-Exonukleasen. (Drager *et al.*, 1996; Barkan & Stern, 1998; Drager & Stern, 1998). Die 3'-seitige Haarnadelstruktur wurde als Exonukleaseschutz bestätigt, indem sie funktionell durch eine Folge von 18 Guanosinen ersetzt werden konnte, die eine charakteristische kompakte Struktur ausbildet (Zimmerman *et al.*, 1975) und so die Prozessivität von Nukleasen hemmt (Decker & Parker, 1993; Muhlrad *et al.*, 1994; Drager *et al.*, 1996).

In höheren Pflanzen sind eine Reihe von mRNA-bindenden Proteinen beschrieben worden, denen jedoch - im Unterschied zu Grünalgen - bislang keine genspezifische Funktion im mRNA-Abbau zugeordnet werden kann. Der 3'→5'-Abbau plastidärer mRNAs wird durch ein

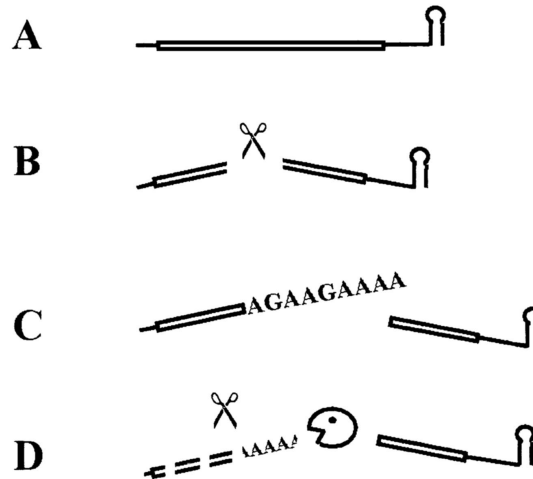


Abbildung 1.1: **Modell des mRNA-Abbauweges in Chloroplasten** (nach Schuster *et al.*, 1999). **A:** Schematische Darstellung des *psbA*-mRNA-Moleküls. Die langgezogene Box repräsentiert die kodierende Region, die dargestellte 3'-terminale Haarnadelstruktur beruht auf der invertierten Sequenzwiederholung innerhalb der 3'-untranslatierten Region. — **B:** Der erste Schritt der mRNA-Degradation ist eine endonukleolytische Spaltung durch eine noch nicht identifizierte Endonuklease. — **C:** Eine poly(A)-reiche Sequenz wird an das 3'-Ende des proximalen Fragmentes angehängt. — **D:** Das polyadenylierte RNA-Fragment wird durch eine 3'→5'-Exonuklease schnell abgebaut.

100 kDa-Protein (100RNP) katalysiert, daß ein Homolog zu der eubakteriellen Polynukleotid-Phosphorylase (PNPase) ist (Hayes *et al.*, 1996). Das 100RNP des Chloroplasten ist offenbar Teil eines größeren Komplexes von etwa 600 kDa, der auch ein 67 kDa-Protein enthält, das eine immunologische Verwandtschaft zur RNase E aus *E. coli* aufweist (Hayes *et al.*, 1996). Damit ist anzunehmen, daß am mRNA-Abbau in Chloroplasten ähnlich wie in Bakterien große Multienzymkomplexe, sog. Degradosomen, beteiligt sind (siehe Kap. 1.3.2; Carpousis *et al.*, 1999). Ein in Chloroplasten beschriebenes 28 kDa-Protein (28RNP) ist offenbar an der Prozessierung von mRNA-3'-Enden beteiligt (Schuster & Grissem, 1991), ebenso die Nuklease CSP41, die sowohl als 3'-End-Prozessierungsenzym (Yohn *et al.*, 1996), als auch als Bindeprotein der 5'-untranslatierten Region (Klaß, unveröffentlicht) gefunden wurde. Das ribosomale Protein S1, das an die 5'-untranslatierten der *psbA*-mRNA bindet, könnte sowohl eine Rolle bei der Regulation der mRNA-Stabilität als auch der Translation spielen

(Alexander *et al.*, 1998), wenn auch nicht in genspezifischer Weise.

In den letzten Jahren zeigte sich, daß in Chloroplasten höherer Pflanzen mRNAs in bemerkenswertem Umfang polyadenyliert werden (Haff & Bogorad, 1976; Kudla *et al.*, 1996; Lisitsky *et al.*, 1996). Polyadenylierung ist im Chloroplasten ein Bestandteil des biochemischen mRNA-Abbauprozesses: mRNA-Moleküle werden im Rahmen der kontrollierten Degradation zunächst endonukleolytisch geschnitten, die entstehenden proximalen (5'-seitigen) Fragmente werden an ihrem 3'-Ende polyadenyliert und damit für den schnellen 3'→5'-exonukleolytischen Abbau markiert. Dabei können die angehängten Poly(A)-Reste bis zu 270 nt lang sein; sie enthalten neben Adenosin auch ca. 25 % Guanosin und 5 % Pyrimidine, so daß man auch von „Poly-Purin-Resten“ sprechen kann (Lisitsky *et al.*, 1996; Lisitsky *et al.*, 1997). Der Abbaupfad plastidärer mRNAs ist in **Abb. 1.1** (nach Schuster *et al.*, 1999) zusammenfassend dargestellt.

1.3.2 Prokaryonten

Die mRNAs von Eubakterien sind vergleichsweise instabil, mit Halbwertszeiten von 20 Sekunden bis zu 50 Minuten, typischerweise im Bereich von 2 – 4 Minuten (Belasco 1993). Zwar gilt in Prokaryonten die Transkription als entscheidende Stufe der Genregulation, es gibt aber eine Reihe von Genen, die zumindest auch auf der Ebene der mRNA-Stabilität reguliert werden, so z. B. die wachstumsratenabhängige Kontrolle der *ompA*-mRNA in *E. coli* (Nilsson *et al.*, 1984), die *sdh*- und *aprE*-mRNAs in *B. subtilis* (Resnekov *et al.*, 1990). In *E. coli* wird der mRNA-Abbau durch die kombinierte Wirkung von Endo- und Exoribonukleasen vermittelt (Nierlich & Murakawa, 1996; Ehretsmann *et al.*, 1992). Bei der *ompA*-mRNA konnte gezeigt werden, daß der Abbau der mRNA durch endonukleolytische Schnitte innerhalb der 5'-untranslatierten Region eingeleitet wird (Lundberg *et al.*, 1990). RNase II und Polynukleotid-Phosphorylase bauen einzelsträngige RNA-Moleküle in 3'→5'-Richtung ab. mRNAs, die eine Haarnadel-Sekundärstruktur am 3'-Ende enthalten, sind gegenüber diesem Abbau geschützt. In diesem Fall gewinnt die RNase E als (einzelsrangspezifische) Endonuklease an Bedeutung: Durch endonukleolytische Schnitte werden 3'-seitige Sekundärstrukturen abgeschnitten und „freie“ 3'-Enden der Wirkung von RNase II und PNPase ausgesetzt. Zusätzlich werden freie mRNA 3'-Enden - wie auch 3'-Enden von Degradationsintermediaten - durch eine Poly(A)-Polymerase polyadenyliert (Carpousis *et al.*, 1999). Man geht davon aus, daß dadurch ein sekundärstrukturfreies RNA-3'-Ende entsteht, das leichter exonukleolytisch abgebaut werden kann (Sakar, 1997; Blum *et al.*, 1999). Die genannten Enzymaktivitäten sind in *E. coli* zu einem ca 600 kDa großen Komplex, dem Degradosom, assoziiert (Py *et al.*, 1996; Miczak *et al.*, 1996; Blum *et al.*, 1997), das mRNA-Moleküle sukzessive vom 3'-Ende her abbaut. Eine 5'→3'-exonukleolytische Aktivität ist in Eubakterien bisher nicht beschrieben worden (Carpousis *et al.*, 1999). Es gibt bisher wenig Informationen über *trans*-regulatorische Faktoren des eubakteriellen mRNA-Abbaus. - Bei der *ompA*-mRNA wirkt das RNA-bindende

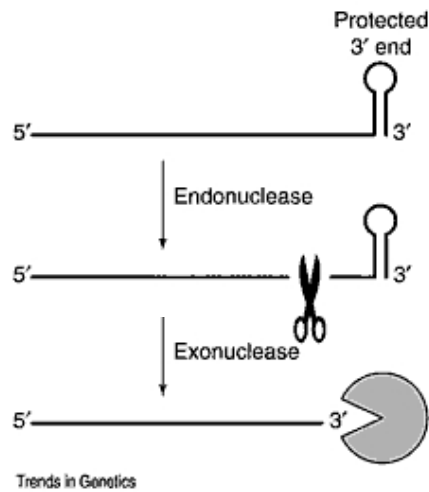


Abbildung 1.2: **mRNA-Abbau in Prokaryonten** (aus Carpousis *et al.*, 1999). Der Abbau eubakterieller mRNAs erfolgt durch initiiierende endonukleolytische Spaltungen des mRNA-Moleküls. Die entstehenden Fragmente sind das Substrat für weiteren 3'→5'-exonukleolytischen Abbau, wobei die freien 3'-Enden der Fragmente polyadenyliert werden können, bevor die 3'→5'-Exonukleolyse erfolgt.

Protein Hfq als Kompetitor der Ribosomenbindung; durch die verhinderte Translation wird diese mRNA empfindlicher gegenüber Schnitten durch die RNase E (Vytvytska *et al.*, 1998; Vytvytska *et al.*, 2000). Der Abbaumechanismus eubakterieller mRNAs ist schematisch (nach Carpousis *et al.*, 1999) in **Abb. 1.2** dargestellt.

1.4 Detailansicht: Die *psbA*-mRNA

1.4.1 Die *psbA*-mRNA wird während der Chloroplastenreifung stabilisiert

Die mRNA des *psbA*-Gens in Chloroplasten höherer Pflanzen kodiert ein Schlüsselprotein des Photosystems II, das D1-Protein. Bei Belichtung und damit bei ablaufender Photosynthese wird das D1-Protein ständig durch photochemische Prozesse zerstört und muß daher zur Aufrechterhaltung des aktiven Photosystems mit hoher Effizienz synthetisiert werden (Übersicht: Melis, 1999). Dementsprechend gehört die *psbA*-mRNA in reifen Chloroplasten zu den hochabundanten mRNAs.

In vivo-Untersuchungen in Spinat konnten zeigen, daß die Stabilität der *psbA*-mRNA während der Blattentwicklung und damit auch während der Chloroplastenreifung deutlich und spezifisch ansteigt (Klaff & Gruissem, 1991). Die Halbwertszeit der *psbA*-mRNA beträgt in jungen

Blättern 4 – 5 Stunden und steigt bis auf 10 Stunden in reifen Blättern an. Im Gegensatz dazu nimmt die Stabilität der *rbcL*-mRNA nur sehr geringfügig von $4\frac{1}{2}$ auf 5 Stunden zu. Die selektive Stabilisierung der *psbA*-mRNA – wie auch in Gerste gezeigt wurde (Kim *et al.*, 1993) – ist im wesentlichen für die starke Akkumulation der mRNA in reifen Chloroplasten verantwortlich.

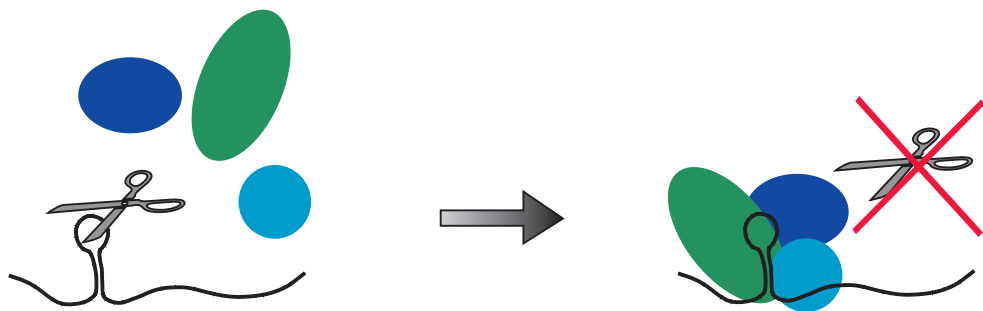
1.4.2 Modelle zur Regulation der Stabilität der *psbA*-mRNA

Eine Voraussetzung für das Verständnis der Regulation der mRNA-Stabilität als Mittel der differentiellen Genexpression sind Kenntnisse über den Mechanismus der mRNA-Degradation. Anhand der *psbA*-mRNA aus Spinat konnten in den letzten Jahren eine Reihe wichtiger Erkenntnisse über die Biochemie des mRNA-Abbaus in Chloroplasten gewonnen werden: Der Abbau der *psbA*-mRNA wird durch endonukleolytische Schnitte eingeleitet, die offenbar vom 5'-Ende zum 3'-Ende hin fortschreiten. Die erste sicher nachweisbare Schnittstelle liegt in der 5'-untranslatierten Region der RNA an Position -48/-49. Weitere distinkte Schnittstellen finden sich in der kodierenden Region; man kann daher vermuten, daß ein *cis*-regulatorisches Element der RNA-Stabilität im 5'-Bereich der mRNA zu finden ist (Klaff, 1995; Klaff, unveröffentlichte Daten). Die Schnittstellen zeigen keine gemeinsame Consensus-Sequenz, die als Endonuklease-Erkennungsmotiv dienen könnte. Allerdings legen Sekundärstrukturvorhersagen und auch DMS-Modifizierungsexperimente nahe, daß die Schnittstellen in einzelsträngigen Bereich der mRNA liegen müssen.

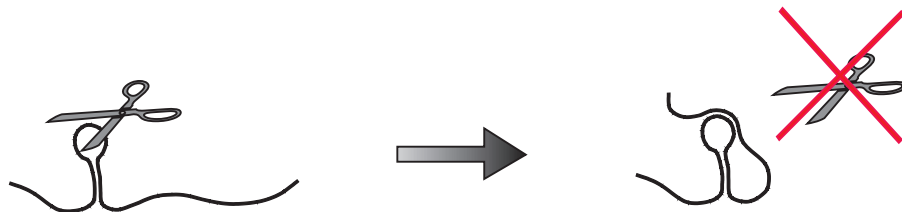
Die durch endonukleolytische Schnitte erzeugten Degradationsintermediate werden an ihren 3'-Enden polyadenyliert bzw. polypurinyliert und dadurch für den schnellen 3'→5'-exonukleolytischen Abbau unter Mitwirkung der plastidären PNPase (100RNP) markiert (Lisitsky *et al.*, 1996; Lisitsky *et al.*, 1997a).

Auf der Suche nach RNA-bindenden Proteinen, die eine Rolle beim Ablauf und/oder bei der Regulation der *psbA*-mRNA-Stabilität spielen könnten, wurden mit Hilfe eines Markierungstransferansatzes drei Protein-Spezies im Bereich von 43 – 47 kDa nachgewiesen, die an die 5'-untranslatierte Region binden: Das ribosomale Protein S1 (Alexander *et al.*, 1998), Die putative Endonuklease CSP41 – auch als Bindeprotein der 3'-untranslatierten Region der *petD*-mRNA beschrieben – (Klaff, unveröffentlicht / Yohn *et al.*, 1996), und ein Protein mit noch unbekannter Funktion (Klaff, unveröffentlicht). Es fehlen jedoch zur Zeit Hinweise darauf, daß eines dieser Proteine eine genspezifische Wirkung auf die Stabilität der *psbA*-mRNA hat.

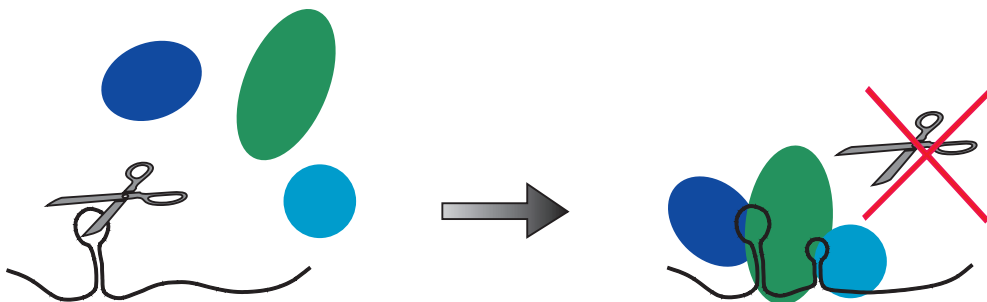
Mit Hilfe einer Kombination aus Verzögerungsgel und Temperaturgradienten-Gelelektrophorese (TGGE / Rosenbaum & Riesner, 1987; Riesner *et al.*, 1991) konnte gezeigt werden, daß die 5'-untranslatierte Region der *psbA*-mRNA in zwei Konformationen vorliegen kann, von denen nur eine Komplexe mit löslichen Chloroplastenproteinen ausbilden kann. Dies ist ein



A. Schutz von Schnittstellen durch Proteinbindung an die RNA



B. Schutz von Schnittstellen allein durch RNA-Strukturänderung



C. Schutz von Schnittstellen durch RNA-Struktur-abhängige Proteinbindung

Abbildung 1.3: Modelle der Regulation des Abbaus der *psbA*-mRNA. — **A:** Schutz von Schnittstellen durch Bindung von Proteinen. — **B:** Regulation der Zugänglichkeit für Endonukleasen durch Konformationsänderungen der mRNA. — **C:** Kombination von A und B – Proteine, die Schutz vor endonukleolytischem Angriff vermitteln, binden in Abhängigkeit von der Konformation der mRNA.

überzeugender Hinweis auf die Bedeutung der mRNA-Struktur für die spezifische Bindung von Proteinen und damit indirekt auch für die Regulation der mRNA-Stabilität.

Aus diesen Befunden lassen sich drei Modelle für die Regulation der mRNA-Degradation ableiten (**Abb. 1.3**). Dabei wird davon ausgegangen, daß die Zugänglichkeit der Schnittstelle(n) in der 5'-untranslatierten Region entscheidend für die Destabilisierung des Transkriptes ist. Ein Schutz vor dem Angriff von Endonukleasen könnte durch die Bindung von Proteinen an die Schnittstellenregion erfolgen (**Abb. 1.3 A**), durch eine Strukturumlagerung der RNA, die zur Maskierung der Schnittstellen durch Doppelstrangbildung führt (**Abb. 1.3 B**) oder durch eine Kombination aus beidem: Eine Konformationsänderung der RNA beeinflußt die Bindung von Proteinen, die ihrerseits die Zugänglichkeit für Endonukleasen regulieren (**Abb. 1.3 C**).

1.5 Problemstellung

psbA-mRNA und *rbcL*-mRNA stellen ein Modellsystem für die Untersuchung entwicklungsabhängiger mRNA-Stabilisierung in Chloroplasten dar, da die Änderung ihrer Stabilität im Verlauf der Chloroplastenreifung *in vivo* gut charakterisiert ist. Sie vertreten die stabilitätskontrollierten mRNAs und solche, die keiner Stabilitätskontrolle unterliegen. Zunächst stand die Frage im Vordergrund, inwieweit die grundlegenden Eigenschaften des RNA-Metabolismus bei höheren Pflanzen konserviert sind, und inwieweit sich dies in konservierten strukturellen Eigenschaften der mRNA-Spezies widerspiegelt. Der zweite Teil der Arbeit hatte die Untersuchung *cis*-regulatorischer Elemente und *trans*-regulatorischer Faktoren zum Inhalt. Dies erfolgte mit Hilfe einer vertieften Analyse des Abbaumechanismus der *psbA*-mRNA. Im Rahmen dieser Studien konnte im weiteren ein neuartiger *trans*-regulatorische Faktor des mRNA-Metabolismus in Chloroplasten identifiziert werden.

mRNA-Stabilität in Chloroplasten *in vivo*

Zur Zeit sind *in vivo*-Werte für mRNA-Halbwertszeiten in Chloroplasten höherer Pflanzen nur aus Spinat (Klafl & Gruissem, 1991), und Gerste (Kim et al., 1993) bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit sollen die Halbwertszeiten plastidärer mRNAs, die repräsentativ für die großen photosynthetischen Enzymkomplexe des Chloroplasten sind, *in vivo* gemessen werden. Als Untersuchungsobjekte werden hierfür Tabak (*Nicotiana tabacum*, *Solanaceae*) und *Arabidopsis thaliana* (*Brassicaceae*) ausgewählt, da diese Pflanzenarten Modellorganismen darstellen, bei denen molekularbiologische und genetische Methoden für eventuelle weitere Untersuchungen gut etabliert sind. Gleichzeitig erhält man zusammen mit den bereits bekannten *in vivo*-Zerfallsdaten aus Spinat und Gerste einen Überblick über den RNA-Metabolismus in Pflanzenarten, die das gesamte Verwandtschaftsspektrum der Angiospermen grob abdecken (Nyffeler, 1999).

Konservierte mRNA-Sekundärstrukturen *in silico*

Als *in silico*-Gegenpart zu den o. g. *in vivo*-Untersuchungen sollen auf Basis der verfügbaren *psbA*- und *rbcL*-mRNA-Sequenzen (Vollängen) der Angiospermen konservierte Sekundärstrukturelemente ermittelt werden. Als Methode dient hierbei das Programm CONSTRUCT (Lück *et al.*, 1997, Lück *et al.*, 1999). Dieses Programm ermöglicht die thermodynamisch kontrollierte Vorhersage konservierter RNA-Sekundärstrukturen und ist unter den Bedingungen einer begrenzten Anzahl zur Verfügung stehender Sequenzen als Werkzeug besonders geeignet.

Regulation des *psbA*-mRNA-Abbaus I: *cis*-Elemente

Bisherige Arbeiten über die spezifische Degradation der *psbA*-mRNA zeigten, daß der Abbau der mRNA durch endonukleolytische Schnitte eingeleitet wird, die sich vom 5'-Ende her an der mRNA entlang fortsetzen. Dabei liegt das vermutete *cis*-regulatorische Element, das die Zugänglichkeit für die Exonuklease(n) vermittelt im 5'-Bereich der mRNA. In einem *in vitro*-Zerfallssystem (nach Klaff, 1995) sollen die zeitlich und örtliche Reihenfolge der Schnitte auf der mRNA genauer charakterisiert werden. Dies sollte erstens an den bereits im Extakt vorliegenden endogenen RNAs erfolgen und zweitens durch den Einsatz von *in vitro*-Transkripten.

Regulation des *psbA*-mRNA-Abbaus II: *trans*-Faktoren

In höheren Pflanzen sind zwar eine Reihe von mRNA-bindenden Proteinen beschrieben bzw. charakterisiert worden, jedoch konnte bis jetzt keinem dieser Proteine die Funktion eines genspezifischen *trans*-regulatorischen Faktors zugeschrieben werden. Eine mögliche Erklärung für diesen Befund wäre die Tatsache, daß solche genspezifischen RNA-Stabilitätsfaktoren in höheren Pflanzen nicht existieren und die differentielle mRNA-Stabilität auf andere Weise – über Eigenschaften der RNA selbst – reguliert werden muß. Dennoch könnten *trans*-regulatorische Faktoren bei der differentiellen mRNA-Stabilität von Bedeutung sein, die Spezifität eines solchen Faktors würde darauf beruhen, daß verschiedenen RNA-Spezies auf verschiedene Weise mit einem Faktor interagieren. Da die RNA-Struktur-spezifische Bindung von Proteinen an die *psbA*-mRNA bereits gezeigt werden konnte (Klaff *et al.*, 1997), waren solche Faktoren von Interesse, die Strukturübergänge von RNA beeinflussen können – wie z. B. Metallionen. In einem *in vitro*-Zerfallssystem aus Spinatchloroplasten sollen verschiedene Ionenbedingungen hinsichtlich ihrer Auswirkung auf die mRNA-Stabilität untersucht werden. Finden sich Kationen mit einer Wirkung auf die Stabilität von Chloroplasten-mRNAs, so soll in diesem Fall eine eventuelle Spezifität für bestimmte mRNAs charakterisiert werden.

Kapitel 2

Material

2.1 Standard-Chemikalien und -Lösungen

2.1.1 Allgemeines

Alle verwendeten Chemikalien wurden – soweit nicht gesondert angegeben – von gängigen Laborchemikalien-Herstellern mit dem Reinheitsgrad *pro analysi* bezogen. Soweit nicht anders beschrieben, wurden alle verwendeten Medien und Puffer als wäßrige Lösungen angesetzt; dabei wurde hochreines Milli-Q-Wasser verwendet, basierend auf demineralisiertem Wasser der Hausanlage mit nachgeschaltetem „Water Purification System“ der Firma MILLIPORE WATERS, Neu-Isenburg. Dieses Wasser entspricht der Qualität *aqua bidestillata* und wird im folgenden als H₂O bezeichnet. Phenol-Lösung zur Nukleinsäureaufreinigung wurde wie folgt angesetzt: 500 g Phenol wurden zunächst mit 1 l 10×-, dann mit 1 l 1×TE-Puffer äquilibriert und mit 0,1 % Hydroxychinolin versetzt (Sambrook *et al.*, 1989).

2.1.2 Häufig verwendete Puffer und Lösungen

TE-Puffer, 10×	100 mM	Tris-HCl, pH 8,0
	10 mM	EDTA

TBE-Puffer, 10×	890 mM	Tris
	890 mM	Borsäure
	25 mM	EDTA

SSC-Puffer, 20×	3,0 M Natriumchlorid 0,3 M Trinatriumcitrat pH ad 7,0 mit HCl
MOPS-Puffer, 10×	200 mM MOPS 50 mM Natriumacetat 10 mM EDTA
Chloroform/Isoamylalkohol	Chloroform wurde mit Isoamylalkohol im Volumenverhältnis 24:1 angesetzt.
Acrylamid [30:0,8]	Die wäßrige Lösung enthielt 30 % Acrylamid und 0,8 % (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid. Zur Entfernung von Acrylsäure-Spuren wurde die Lösung mit Amberlite MB3 Ionenaustauscher einige Stunden gerührt und anschließend filtriert.

2.2 Spezielle Materialien

2.2.1 Pflanzen

Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana* L. cv. Columbia) wurde auf der Laborbank in handelsüblichem Torfkultursubstrat bei 20 – 22 °C aus Samen herangezogen. Die Pflanzen wurden 12 Stunden pro Tag beleuchtet (Philips SON-T 400 Hochdruck-Natriumdampflampe).

Spinat (*Spinacia oleracea* L. cv. Monnopa) wurde – soweit nicht anders angegeben – im Gewächshaus auf Torfkultursubstrat aus Samen herangezogen. Die Temperatur war auf 16 – 18 °C eingestellt, lag aber in den Sommermonaten oft deutlich darüber. Während der Wintermonate (Oktober bis Februar) wurden die Pflanzen von 16.00 bis 19.00 Uhr und von 7.00 bis 10.00 Uhr zusätzlich künstlich beleuchtet (Philips SON-T 400 Hochdruck-Natriumdampflampen). Wenn die Beleuchtungsstärke durch Sonneneinstrahlung über 50.000 lux anstieg, wurden die Pflanzen durch eine Schattiereinrichtung vor Sonnenlicht geschützt.

Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum* L. cv. Xanthi nc) wurden ähnlich wie Spinat während des ganzen Jahres hindurch im Gewächshaus in Torfkultursubstrat gezogen. Die Temperatur betrug ca. 26 – 28 °C. Von September bis März wurden die Pflanzen von 6.00 – 10.30 und 16.00 – 21.00 zusätzlich künstlich beleuchtet (Philips SON-T 400 Hochdruck-Natriumdampflampen),

um kontinuierliche Langtagbedingungen zu gewährleisten. Bei starker Sonneneinstrahlung (Beleuchtungsstärke über ca. 60.000 lux) sorgte automatische Schattierung für gleichmäßigere Belichtung.

Zur Anzucht wurden Tabaksamen in Saaterde gekeimt und nach Reifung der Kotyledonen in Einzeltöpfe (Pflanzerde und Torfkultursubstrat im Verhältnis 1:1) pikiert und gegebenenfalls später in größere Töpfe umgesetzt.

2.2.2 Nukleinsäuren

Chloroplasten-DNA aus Spinat

Aufgereinigte Chloroplasten-DNA aus Spinat, die als Ausgangsmaterial für PCR-Amplifikationen diente, wurde freundlicherweise von Dr. Petra Klaff und Elke Reinartz zur Verfügung gestellt.

DNA-Oligonukleotide

DNA-Oligonukleotide, die als Hybridisierungssonden in Northern-Analysen und bei PCR-Amplifikationen Verwendung fanden, wurden – nach der Phosphoramidit-Methode synthetisiert – von der Firma INTERACTIVA, Ulm, in HPLC-aufgereinigter Form bezogen. Eine Ausnahme bildeten die Tabak-spezifischen Oligonukleotide, die im Hause mittels eines automatischen DNA-Synthesizer (APPLIED BIOSYSTEMS „381A DNA Synthesizer“) hergestellt wurden. Die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide sind in Kap. 7 (Dokumentationen) aufgelistet.

Kapitel 3

Methoden

3.1 Cytologische Methoden

3.1.1 Isolierung von Chloroplasten / Präparation lysierter Chloroplasten

Chloroplasten wurden grundsätzlich nach folgendem Protokoll aus Spinatblättern hergestellt und dienten als Material für *in-vitro*-RNA-Zerfallssysteme:

Etwa 300 g reife Spinatblätter aus dem Gewächshaus wurden morgens (max. zwei Stunden nach Sonnenaufgang) geerntet und zur Reinigung mit demineralisiertem Wasser abgespült. Alle folgenden Arbeiten fanden bei 4 °C im Kühlraum statt. Die Blätter wurden in Portionen zu ca. 50 g in je etwa 100 ml HEPES/Sorbit-Medium im Waring-Blendor homogenisiert (einmal 5 Sekunden auf Stufe „low“, viermal 5 Sekunden auf Stufe „high“) und das Homogenat durch vier Lagen MIRACLOTH (CALBIOCHEM, USA) filtriert. Nach der anschließenden Zentrifugation (Beckman JA14-Rotor, 6000 rpm, 2 min) wurde der Überstand, der u. a. zerbrochene Chloroplasten enthält, dekantiert und die Pellets in ca. 20 ml HEPES/Sorbit-Medium mit Hilfe eines weichen Pinsels resuspendiert. Dann wurde die Suspension auf vier 40 ml-Percoll-Gradienten (lineare Gradienten von 20 – 80 % Percoll) geschichtet und 20 min zentrifugiert (Beckman JS7.5-Rotor, 7000 rpm); dabei bandieren die intakten Chloroplasten unterhalb der beschädigten, deren Hüllmembran nicht mehr intakt ist. Die intakten Chloroplasten wurden vorsichtig mit einer 10-ml-Glaspipette geerntet und in zwei 80-ml-Zentrifugengläser überführt. Nach Auffüllen mit HEPES/Sorbit-Medium erfolgte eine erneute Zentrifugation (Beckman GPKR-Zentrifuge, 3750 rpm, 2 min). Danach wurden die pelletierten Chloroplasten noch zweimal in HEPES/Sorbit-Medium gewaschen und zuletzt in ca. 10 ml Extraktpuffer resuspendiert. Nun wurden die Chloroplasten auf Eis in einem 15-ml-Potter fünfmal mit Stößel „L“ und fünfmal mit Stößel „S“ mechanisch lysiert und in 500- μ l-Portionen sofort bei –70 °C eingefroren.

HEPES/Sorbit-Medium	Sorbit	410 mM
	HEPES	50 mM, pH mit KOH auf 7,9 eingestellt
	DTT	5 mM

Gradientenlösung:	Sorbit	410 mM
	HEPES	50 mM
	KOH	15 mM, ad pH 7,9
	β -Mercaptoethanol	10 mM
	PCBF-Lösung	20 % (v/v) bzw. 80 % (v/v)

PCBF-Lösung:	PEG 6000	30 mg/ml
	Ficoll 70	10 mg/ml
	BSA	10 mg/ml
	gelöst in Percoll	

Extraktpuffer:	HEPES	20 mM
	β -Mercaptoethanol	10 mM
	KCl	60 mM
	KOH	15 mM, ad pH 7,9
	Glyzerin	20 % (v/v)

Dem Extraktpuffer wurde ggf. – je nach Anforderung des Experiments – 20 mM EDTA zugesetzt.

3.1.2 Konzentrationsbestimmung von Chloroplastenextrakten

Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration von rohen Chloroplastenextrakten erfolgte nach der Methode von Bradford (Bradford, 1976): 20 μ l Probe (Chloroplastenlysat), ggf. vorverdünnt, wurden mit 50 μ l 1 M NaOH und 1 ml Bradford-Reagenz versetzt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde die Absorption der Probe bei $\lambda = 595$ nm gegen eine Blindprobe gemessen (BECKMAN DU 640 Spectrophotometer), wobei die Proteinkonzentration durch Vergleich mit einer Eichkurve (basierend auf BSA) bestimmt wurde.

Bradford-Reagenz:	Serva Blue G (SERVA, Heidelberg)	100 mg
	Phosphorsäure, 85 % (w/v)	100 ml
	Ethanol, 96 % (v/v)	50 ml
	H ₂ O	ad 1000 ml

Chlorophyllbestimmung

Die Chlorophyllbestimmung erfolgte nach Arnon (Arnon, 1949). 20 µl Probe wurden mit 980 µl 80 % (v/v) Aceton versetzt, gut durchmischt und 5 min bei 12.000 rpm zentrifugiert. Danach wurde die Absorption des Überstandes bei $\lambda = 645$ nm und $\lambda = 663$ nm gegen eine Blindprobe gemessen (BECKMAN DU 640 Spectrophotometer). Die Chlorophyllkonzentration ergibt sich dann folgendermaßen:

$$c \text{ [mg/l]} = 20,2 \cdot A_{645} + 8,02 \cdot A_{663}$$

3.1.3 Fraktionierung von Chloroplasten zur Mg²⁺-Bestimmung

Aufgereinigte Chloroplasten wurden vor dem Lysieren zunächst gezählt. Der Chloroplasten-suspension wurden Aliquots entnommen, 5fach bis 20fach verdünnt, und die Chloroplasten unter dem Mikroskop in der Thoma-Zählkammer ausgezählt. Die Bestimmung der Gesamtzahl der isolierten Chloroplasten ermöglichte die Einstellung der präparierten Stromafraktion auf ein immer gleiches Plastidenzahl/Volumen-Verhältnis von $8,5 \times 10^8$ Plastiden/ml. Nach Lysieren der Chloroplasten in Extrakt-puffer (ohne EDTA/MgCl₂) wurde der Suspension ein Aliquot für eine spätere Protein- und Chlorophyllbestimmung entnommen und der Rest für 30 min bei 20.000 rpm im JA20-Rotor zentrifugiert und der Überstand, der dem mit Extrakt-puffer verdünntem Stromainhalt entspricht, vorsichtig entnommen und in 0,5 ml bis 2 ml-Portionen bei -70 °C eingefroren. Das so gewonnene Chloroplasten-Stroma war das Ausgangsmaterial für die Bestimmung der freien Mg²⁺-Konzentration (siehe 3.1.4).

3.1.4 Bestimmungen der Konzentration von freien Mg²⁺-Ionen in Chloroplastenextrakten

Die Bestimmung der Konzentration freier Magnesiumionen erfolgte mit Hilfe einer von J. McGuigan entwickelten potentiometrischen Methode (Zhang *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1997; Lüthi *et al.*, 1997). Das gemessene Elektrodenpotential ist mit der Konzentration an freien Magnesiumionen in folgender Weise verknüpft:

$$\text{Potential } U = U_0 + s \cdot \log (\gamma_{\pm}^2 \cdot [\text{Mg}^{2+}]_{\text{frei}} + \sum K_i a_i^{z_{\text{Mg}}/z_i})$$

Dabei ist U_0 eine Konstante des Meßsystems, s ist die Steigung („Steilheit der Elektrode“), $\gamma_{\pm}$ ist der mittlere Aktivitätskoeffizient von MgCl₂. $\gamma_{\pm}^2$ repräsentiert den Aktivitätskoeffizient

des einzelnen Magnesiumions – er wird unter den Bedingungen der in dieser Arbeit durchgeführten Messungen mit 1 angenähert. Der Beitrag der Aktivität a_i interferierender Ionen K_i zum Potential ist durch $\sum K_i a_i^{z_{Mg}/z_i}$ gegeben ($z \equiv$ Ladungszahl der betreffenden Ionen). Bei $[Mg^{2+}]_{frei} \geq 0,15$ mM konnte der Effekt anderer Ionen vernachlässigt werden. Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen wurde daher der Abhängigkeit des Elektrodenpotentials von der Magnesiumkonzentration folgende vereinfachte Beziehung zugrunde gelegt:

$$\text{Potential } U = U_0 + s \cdot \log [Mg^{2+}]_{frei}$$

Eine magnesiumspezifische Makroelektrode (ETH 7025) wurde im Extaktpuffer – dem Basispuffer der lysierten Chloroplasten (siehe 3.1.1/3.1.3) – mit Magnesiumkonzentrationen von 20 bis 0,15 mM in absteigender Reihenfolge kalibriert. Unmittelbar anschließend wurde in bis zu elf Stroma-Proben (Kap. 3.1.3) das magnesiumabhängige Potential bestimmt. Danach wurde die Kalibrierung der Magnesiumelektrode wiederholt, um eine mögliche Drift des Potentials zu überprüfen. Die Kalibrierungskurven waren in einem Bereich von 20 – 0,15 mM Mg^{2+} linear (Regressionskoeffizient $> 0,98$).

3.1.5 Größenbestimmung von Chloroplasten

Von auf einer Thoma-Zählkammer ausgebreiteten Chloroplasten wurden Mikrofotografien angefertigt (Durchlicht-Fotomikroskop, Fa. ZEISS), auf denen neben den Chloroplasten auch die Linien der Kleinquadrate erkennbar waren – diese dienten als Längenmaßstab. Die Fotografien wurden in TIFF-Dateien überführt und die Chloroplasten mit dem Programm SCIONIMAGE (SCIONCORP, USA, <http://www.scioncorp.com>) vermessen. Zur Volumenbestimmung wurden die Chloroplasten als Rotationsellipsoide angenähert (Klein & Mullet, 1987). Das Volumen ergibt sich aus den Längen l und Breiten w der Chloroplasten wie folgt:

$$V = \frac{2\pi \cdot w}{3} \cdot \left(\frac{l}{2}\right)^2$$

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Nukleinsäure-Fällungen

Natriumacetat/Ethanol-Fällung

Die wässrige Nukleinsäurelösung wurde mit $\frac{1}{10}$ Vol. 3 M Natriumacetat auf 0,3 M Natriumacetat eingestellt und mit $2\frac{1}{2} - 3$ Vol. 96 % (v/v) Ethanol gemischt. Nach Inkubation für mind. 1 h bei -20°C wurde die gefällte Nukleinsäure $\frac{1}{2} - 1$ h bei $20.000 - 25.000 \times g$ abzentrifugiert. Das Pellet wurde ggf. noch einmal mit 70 % (v/v) Ethanol gespült und abermals für 15 min

zentrifugiert. Danach wurde das Pellet an der Luft getrocknet und zur Weiterverarbeitung im jeweiligen Puffer rückgelöst.

Natriumacetat/Isopropanol-Fällung

Die auf 0,3 M Natriumacetat eingestellte Nukleinsäurelösung wurde mit 1 Vol. Isopropanol versetzt und wie vorstehend beschrieben gefällt und zentrifugiert. Anschließend folgte ggf. eine Ethanol-Waschung des Pellets. Die gefällte Nukleinsäure wurde an der Luft getrocknet und im jeweiligen Puffer gelöst.

Ammoniumacetat/Ethanol-Fällung

Nukleinsäurefällungen mit Ammoniumacetat dienen der Abtrennung überschüssiger Mononukleotide bei radioaktiven Markierungsreaktionen, da bei dieser Fällungsmethode (unterstützt durch Komplexbildung mit Mg^{2+} -Ionen) Mononukleotide in Lösung bleiben. Die Nukleinsäurelösung wurde mit $\frac{1}{20}$ Vol. 1 M $MgCl_2$ (Endkonz. 30 mM) und $\frac{1}{2}$ Vol. 7,5 M NH_4OAc (Endkonz. 2,5 M) versetzt und mit 3 Vol. 96 % (v/v) Ethanol für 1 h bei -20 °C gefällt. Anschließend wurde 1 h bei 20.000-25.000 $\times g$ zentrifugiert. Nach Lösen des Pellets in 20 μl Wasser wurde die Fällung wiederholt. Dann wurde das Pellet kurz an der Luft getrocknet und im jeweiligen Puffer gelöst.

3.2.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren wurden UV-Spektren mit einem Spektralphotometer (BECKMAN DU 640 Spectrophotometer) aufgenommen. Zwischen gemessener Absorption und Nukleinsäurekonzentration besteht folgende Beziehung (Sambrook *et al.*, 1989):

RNA	1 $A_{260} \equiv 40 \mu g/ml$
DNA	1 $A_{260} \equiv 50 \mu g/ml$
Oligonukleotide	1 $A_{260} \equiv 33 \mu g/ml$

3.2.3 Präparation von Gesamt-RNA aus Pflanzen

A. Präparation von Gesamt-RNA aus Tabak- und *Arabidopsis*-Blättern

Die Isolierung von intakter Gesamt-RNA aus Blattgewebe wurde sowohl für Tabak als auch für *Arabidopsis* nach dem gleichen Verfahren, der Guanidinium-Methode, durchgeführt (Barkan, 1988). Abweichend wurde auf eine Entfernung der DNA mittels RNase-freier DNase verzichtet, da die präparierte RNA nur für Northern-Analysen verwendet wurde, bei denen störende Effekte durch anwesende DNA nicht festgestellt werden konnten (Horlitz, 1995).

- Etwa 10 g Blattmaterial (frisch oder bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert) wurden in flüssigem Stickstoff gemörsernt; das Blattpulver wurde in einem zweiten Mörser mit 20 ml Guanidinium-Puffer bis zum Auftauen weiter homogenisiert und in ein 50-ml-Zentrifugenröhrchen überführt.
- Zentrifugation für 20 min bei 3750 rpm und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Beckman GPKR-Zentrifuge), um grobe Zellbestandteile zu pelletieren.
- Der Überstand wurde mit 0,03 Vol. 3 M Na-Acetat und $\frac{3}{4}$ Vol. Ethanol versetzt und somit die Nukleinsäuren für 15 min bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gefällt.
- Zentrifugation für 60 min bei 3750 rpm und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Beckman GPKR-Zentrifuge); Pelletieren der Nukleinsäuren.
- Das Pellet wird in 10 ml SDS-Puffer resuspendiert, Zugabe von 2 Vol. Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1), gründliches Mischen.
- Zentrifugation für 15 min bei 3750 rpm, $15\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Die wäßrige Phase wurde mit 1 Vol. Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert und erneut 15 min zentrifugiert.
- Die wäßrige Phase wurde mit 5 M NaCl auf 0,2 M NaCl eingestellt und mit 1 Vol. Isopropanol gefällt.
- Die gefällte Nukleinsäure wurde in $300\text{ }\mu\text{l}$ TE-Puffer mit 0,3 M Na-Acetat rückgelöst und mit Ethanol gefällt.
- Zuletzt wurde die Gesamt-RNA in $30 - 50\text{ }\mu\text{l}$ TE-Puffer aufgenommen und bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Guanidinium-Puffer:	Guanidiniumthiocyanat	5 M
	Tris-HCl, pH 8	25 mM
	EDTA	10 mM
	N-Lauroylsarcosinat (Na-Salz)	2 % (w/v)
	<i>frisch dazugeben:</i>	
	β -Mercaptoethanol	0,1 M
	Diethyldithiocarbamat	4 mg/ml

SDS-Puffer:	Tris-HCl, pH 8	50 mM
	NaCl	100 mM
	EDTA	10 mM
	SDS	0,5 % (w/v)
	<i>frisch dazugeben:</i>	
	Diethyldithiocarbamat	4 mg/ml

B. Präparation von RNA aus lysierten Spinat-Chloroplasten

Dieses RNA-Präparationsprotokoll diente zur Isolierung der RNA im Rahmen von RNA-Zerfallsexperimenten in intakten (*in organello*) oder lysierten Chloroplasten (*in vitro*-RNA-Zerfallssystem) und wurde wie im folgenden beschrieben durchgeführt (Zerfallsexperimente unter Einsatz von ^{32}P -markierten *in-vitro*-Transkripten). Bei nichtradioaktiven Experimenten (RNA-Nachweis durch anschließende Northern-Analyse) wurde dieses Protokoll mit dreifachen Volumina durchgeführt.

- In einem Eppendorf-Reaktionsgefäß wurden 150 μl Stop-Lösung und 200 μl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) vorgelegt.
- 30 μl lysierte bzw. intakte Chloroplasten wurden zugegeben und die Probe gründlich auf dem Vortex-Mischer homogenisiert.
- Die Emulsion wurde zur Phasentrennung 10-20 min bei 12.000 rpm und 20 °C (Eppendorf-Zentrifuge) zentrifugiert.
- Die wäßrige Phase (ca. 150 μl) wurde mit $\frac{1}{10}$ Vol. 3 M Na-Acetat versetzt und mit Isopropanol gefällt.
- Die RNA wurde durch eine 30 min-Zentrifugation (12.000 rpm / 4 °C) pelletiert.
- Das RNA-Pellet wurde entweder in 20–40 μl Formamid-Auftragspuffer aufgenommen (radioaktiv markierte RNA-Proben), oder in 30 μl TE-Puffer (nichtradioaktive RNA, anschließende Northern-Analyse).

Stop-Lösung:	Harnstoff	4 M
	Tris-HCl, pH 8	20 mM
	EDTA	50 mM
	SDS	1 % (w/v)

3.2.4 Biochemische Synthese von Nukleinsäuren

Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde im Rahmen dieser Arbeit ausschließlich als präparative Methode angewendet, sie diente zur Gewinnung der für die Herstellung von *in-vitro*-Transkripten benötigten Matrizen-DNA. Dabei wurde mit Hilfe eines Primers ein T7-Promotor am 5'-Ende des PCR-Produktes eingeführt. Für alle verwendeten Primer-Kombinationen wurden die gleichen Reaktionsbedingungen (Zyklustemperatur und -dauer) gewählt. Die eingesetzte Taq-DNA-Polymerase stammte von der Firma PROMEGA. Der fertige Reaktionsansatz wurde stets mit 50 – 100 μ l Paraffinöl überschichtet, alle Pipettierschritte wurden mit Filterspitzen durchgeführt.

Reaktionsansatz (100 μ l):	68,6 μ l	H ₂ O
	10 μ l	dNTPs je 2 mM
	1 μ l	ctDNA 500 ng/ μ l
	2 μ l	Primer 1 (mit T7-Promotor), 10 pmol/ μ l
	2 μ l	Primer 2. 10 pmol/ μ l
	6 μ l	MgCl ₂ (PROMEGA), 25 mM
	0,4 μ l	Taq-Polymerase (PROMEGA)
	10 μ l	Taq-Pol.-Puffer (PROMEGA), 10 $\times$ konz.

Die PCR wurde in einem Thermocycler der Firma LANDGRAF durchgeführt, dabei wurde immer die gleiche Zyklusreihenfolge festgelegt:

	Anfangszyklus (1 mal)	Syntheszyklen (35 mal)	Schlußzyklus (1 mal)
Denaturierung	94 °C / 120 sec	94 °C / 60 sec	94 °C / 60 sec
Hybridisierung	45 °C / 90 sec	45 °C / 90 sec	45 °C / 90 sec
Polymerisation	72 °C / 120 sec	72 °C / 120 sec	72 °C / 240 sec

Herstellung von *in-vitro*-Transkripten

Zur Gewinnung von *in-vitro*-Transkripten mit Hilfe der T7-RNA-Polymerase¹ wurde ein Protokoll von Hecker (1989) angewendet. Im Rahmen dieser Arbeit wurden *in-vitro*-Transkripte ausschließlich von PCR-Produkten als DNA-Matrize hergestellt. Der Reaktionsansatz wurde mindestens zwei Stunden bei 37 °C im Heatblock inkubiert; bei längerer Inkubation wurde erneut T7-RNA-Polymerase und ggf. NTPs zugegeben. Nach Inkubation wurde der Reaktionsansatz mit Natriumacetat/Ethanol – im Falle von radioaktiv markierten Transkripten

¹aus hauseigener Herstellung

mit Ammoniumacetat/Ethanol – gefällt und zur gelelektrophoretischen Aufreinigung in 20 – 40 μl Formamid-Auftragspuffer aufgenommen. Dann wurden die Reaktionsprodukte in einer leistungsgesteuerten Gelelektrophorese aufgetrennt und die synthetisierte RNA durch Ethidiumbromidfärbung bzw. Autoradiographie nachgewiesen. Die Bande, die der erwarteten Transkriptlänge entsprach, wurde ausgeschnitten und in 300 μl Elutionspuffer überführt. Die Elution der RNA erfolgte auf einem Schüttler bei Raumtemperatur für mindestens 15 h. Das Eluat konnte durch Zugabe von 3 Vol. Ethanol direkt gefällt werden, Nach Rücklösen der RNA in einer geeigneten Menge TE-Puffer oder Extrakt-puffer (siehe Kap. 3.1.1)² erfolgte bei unmarkierten Transkripten eine gelelektrophoretische Konzentrationsbestimmung, bei ^{32}P -markierten Transkripten wurde die Ausbeute durch Cerenkov-Zählung in einem Szintillationszähler (BECKMAN) bestimmt. Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente gilt für radioaktive Vollängen-Transkripte der *psbA*- und *rbcL*-mRNA aus Spinat die folgende Beziehung: 100 cpm gemessene Cerenkov-Aktivität entsprechen 1 fmol RNA.

Reaktionsansatz:

^{32}P -markierte Transkripte		unmarkierte Transkripte	
IVT-A	5 μl	IVT-A	20 μl
IVT-B	5 μl	IVT-B	20 μl
ATP/CTP/GTP je 5mM	5 μl	ATP/CTP/GTP/UTP je 15 mM	15 μl
UTP 0,5 mM	5 μl	DNA, 30 – 40 ng/ μl (PCR-Prod.)	20 μl
DNA, 30 – 40 ng/ μl (PCR-Produkt)	3 μl	RNAsin, 40 u/ μl (PROMEGA)	2 μl
RNAsin, 40 u/ μl (PROMEGA)	1 μl	T7-RNA-Polymerase ($\approx 60 \text{ U}/\mu\text{l}$)	2 μl
α - ^{32}P -UTP (3000 Ci/mmol, 10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$)	5 μl	H ₂ O	20 μl
T7-PNA-Polymerase ($\approx 60 \text{ U}/\mu\text{l}$)	1 μl		

IVT-A (5 $\times$): 100 mM Na₂HPO₄
50 mM DTT

IVT-B (5 $\times$): 40 mM MgCl₂
20 mM Spermidin

Elutionspuffer: 270 μl H₂O
30 μl 3 M Na-Acetat
6 μl 0,5 M EDTA
6 μl 10 % (w/v) SDS

²bei Verwendung der RNA im *in-vitro*-Zerfallssystem

Herstellung von teilweise doppelsträngigen *in-vitro*-Transkripten

Im Rahmen von *in-vitro*-RNA-Zerfallsexperimenten wurden teilweise doppelsträngige ^{32}P -markierte Transkripte hergestellt. Dabei wurden markierte Vollängen-*sense*-Transkripte der *psbA*-mRNA aus Spinat mit verschiedenen unmarkierten *psbA*-antisense-Transkripten hybridisiert. Die Hybridisierung wurde in Extraktbuffer (Kap. 3.1.1) durchgeführt; zunächst wurde der Ansatz in einem PCR-Thermocycler für 10 min auf 90 °C erhitzt und dann über einen Zeitraum von 20 h auf 20 °C mit konstanter Rate abgekühlt. Dabei kam es zur Hybridisierung der radioaktiven *sense*-RNA mit den unmarkierten antisense-Molekülen. Nach Beendigung der Hybridisierung konnte die RNA ohne weitere Behandlung für *in-vitro*-Zerfallsexperimente verwendet werden.

Hybridisierungs-Ansatz:	<i>sense</i> -Transkript, ^{32}P -markiert, in Extraktbuffer	50 fmol
	<i>antisense</i> -Transkript, unmarkiert, in Extraktbuffer	150 fmol
	Extraktbuffer (mit 20 mM EDTA als Endkonzentration)	ad 50 μl

RNase-Schutz-Experimente

Zur Überprüfung der erfolgreichen Herstellung von RNA-Doppelsträngen wurden RNase-Schutz-Experiments durchgeführt. Dabei wird die (teilweise) doppelsträngige RNA mit RNase A unter Hochsalzbedingungen (500 mM NaCl) verdaut. Unter solchen Bedingungen schneidet RNase A nur einzelsträngige RNA, im Falle von teil-doppelsträngigen RNA-Molekülen werden die einzelsträngigen Bereiche vollständig verdaut, während die Doppelstrang-Regionen übrig bleiben und auf einem denaturierenden Gel nachgewiesen werden können.

Reaktionsansatz (20 μl):	^{32}P -RNA	5 μl
	5 M NaCl	2 μl
	H ₂ O	11 μl
	RNase A (2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	2 μl

Die Inkubation erfolgte bei 23 °C für 45 min. Dann wurde der Ansatz einer RNA-Präparation (entsprechend nach Kap. 3.2.3) unterzogen.

5'-Endmarkierung von Oligonukleotiden mit ^{32}P

Die chemisch synthetisierten Oligonukleotide besitzen eine freie 5'-OH-Gruppe, die direkt phosphoryliert werden kann. Dazu wird das Enzym Polynukleotidkinase (PNK) verwendet,

das die endständige γ -Phosphatgruppe von ATP auf freie Nukleinsäure-5'-Enden überträgt. Setzt man γ - ^{32}P -ATP ein, so werden Nukleinsäuren am 5'-Ende radioaktiv markiert. Die Markierungsreaktionen wurden nach folgendem Ansatz durchgeführt:

Reaktionsansatz (20 μl):

DNA-Oligonukleotid, 10 mM	0,5 μl (5 pmol)
10 $\times$ Polynukleotidkinase-Puffer	2 μl
H ₂ O	11,5 μl
Polynukleotidkinase, 10 U/ μl (BOEHRINGER)	1 μl
γ - ^{32}P -ATP (5000 Ci/mmol, 10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$)	5 μl

Der Reaktionsansatz wurde über Nacht (14–18 h) auf Eis inkubiert und dann mit Ammoniumacetat/Ethanol gefällt. Danach wurde das Pellet in 20 μl Wasser aufgenommen und nochmals mit Ammoniumacetat/Ethanol gefällt. Das Pellet wurde in 100 μl TE-Puffer mit 0,1 % (w/v) SDS gelöst und die Gesamt-Radioaktivität des Oligonukleotids durch Cerenkov-Zählung bestimmt; diese lag bei $8 - 30 \times 10^6$ cpm.

10 $\times$ PNK-Puffer:	Tris-HCl	500 mM
	MgCl ₂	100 mM
	DTT	50 mM
	Spermidin-HCl	1 mM
	EDTA	1 mM

3.2.5 Gelelektrophoresen

Leistungsgesteuerte Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die leistungsgesteuerte Polyacrylamidgelelektrophorese ist ein Verfahren zur Auftrennung von Nukleinsäuren unter denaturierenden Bedingungen, bei der die notwendige Denaturierungstemperatur durch den hohen Elektrophoresestrom erzeugt wird. In der Regel wurden Gele aus 5 % Polyacrylamid [30:0,8] in der Größe 20 $\times$ 20 $\times$ 0,05 cm oder 40 $\times$ 30 $\times$ 0,05 cm hergestellt, wobei die Polymerisationszeit mindestens 60 min bei Raumtemperatur betrug. Die kleineren Gele wurden – wenn sich kein Northern-Transfer anschloß – zwischen Glasplatten auf die hydrophile Seite einer GELBOND-Folie (FMC BIOPRODUCTS) aufpolymerisiert. Wenn das Gel nach der Elektrophorese für einen Kapillartransfer (Northern-Analyse) weiterverwendet werden sollte, wurde die GELBOND-Folie weggelassen. Um die Wärmeverteilung zu optimieren, wurde auf einer der Glasplatten eine 2 mm dicke Aluminiumplatte befestigt. Zum Vorheizen des Gels wurden vor dem Auftragen der Proben für 20 min 50 W angelegt. Die Proben wurden 1:1 mit Auftragspuffer gemischt oder darin gelöst, bei 95 °C für 5 min denaturiert und sofort

aufgetragen. Die Elektrophorese lief bei 40 – 50 W etwa 20 min (kleinere Gele) bzw. 80 – 110 W etwa 50 min (größere Gele) bei einer Geltemperatur von 50 – 60 °C. Danach schlossen sich folgende alternative Nachweisverfahren an: Silberfärbung der Nukleinsäure, Autoradiographie ^{32}P -markierter RNA, oder ein Kapillartransfer der aufgetrennten RNA (Northern-Analyse).

Gellösung:	Harnstoff	8 M
	Acrylamid	5 % (w/v)
	TBE-Puffer	0,5×
	TEMED	0,1 % (v/v)
	APS	0,03 % (w/v)

Auftragspuffer:	Formamid	90 % (v/v)
	EDTA	5 mM
	Bromphenolblau	0,01 %
	Xylencyanol	0,01 %

Silberfärbung von Polyacrylamidgelen

Die in einer Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennten Nukleinsäuren können durch eine Silberfärbung nachgewiesen werden (Schumacher *et al.* 1983b). Diese Färbemethode besitzt eine Nachweisempfindlichkeit von ca. 0,5 – 0,1 ng pro Bande. Der Färbeeffekt beruht darauf, daß sich die Ag^+ -Ionen einer Silbernitratlösung an die negativ geladenen Phosphodiester-Gruppen des Nukleinsäurerückgrates aufgrund elektrostatischer Wechselwirkung anlagern; anschließendes Reduzieren der Ag^+ -Ionen zu metallischem Silber durch Formaldehyd läßt die nukleinsäurehaltigen Gelbereiche braungefärbt hervortreten. Alle Inkubationen erfolgten in Kunststoffschalen auf einem Gelschüttler.

Fixieren:	Ethanol	10 % (v/v)	
	Essigsäure	0,5 % (v/v)	≥ 15 min
Färben:	AgNO_3	0,19 % (w/v)	30 min
Waschen:	H_2O		viermal 10 s
Entwickeln:	NaOH	1,5 % (w/v)	
	NaBH_4	0,08 % (w/v)	
	Formaldehyd	0,15 % (w/v)	beobachten
Stoppen:	NaHCO_3	0,75 % (w/v)	≥ 15 min

Denaturierende Agarosegelelektrophorese

Zur Auftrennung von RNA in Abhängigkeit von Molekulargewicht bzw. Moleküllänge wurden Gelelektrophoresen in 1,2 % Agarosegelen in Gegenwart von 6 % Formaldehyd als Denaturierungsmittel durchgeführt (nach Sambrook *et al.* 1989). Dazu wurden mit 220 ml Gellösung 21 cm × 21 cm große Gele gegossen, die zwei Reihen Probenauftragstaschen enthielten, so daß die Trennstrecke ca. 10 cm betrug. Die aufzutragende in TE-Puffer gelöste RNA (typischerweise ca. 10 – 20 µg) wurde mit 1 Vol. Denaturierungspuffer versetzt und 15 min auf 65 °C erhitzt. Dann wurde die denaturierte RNA sofort auf Eis abgeschreckt, mit ca. $\frac{1}{3}$ Vol. Auftragspuffer vermischt und auf das Gel aufgetragen. Die nachfolgende Elektrophorese dauerte bei 150 V (entspr. 5 V/cm) etwa 2 h.

Gellösung:	Agarose	1,2 % (w/v)
	Formaldehyd	6 % (w/v)
	MOPS-Puffer	1×
Denaturierungspuffer:	Formaldehyd	24 % (w/v)
	MOPS-Puffer	3,5×
	Ethidiumbromid	40 µg/ml
Auftragspuffer:	Glycerin	50 % (v/v)
	EDTA	5 mM
	Bromphenolblau	0,01 % (w/v)
	Xylencyanol	0,01 % (w/v)

Ethidiumbromidfärbung

Zum Nachweis aufgetrennter RNA in Agarose- oder Polyacrylamidgelen wurde das Gel in Ethidiumbromidlösung (1 µg/ml) für 10 min geschwenkt; die Hintergrundfärbung wurde durch kurzes Waschen in Wasser (5 – 10 min) reduziert. Außerdem wurde die Effizienz des Northern-Transfers (s. u.) durch Ethidiumbromidfärbung überprüft. In diesem Fall wurde das Ethidiumbromid bereits vor der Elektrophorese zu den RNA-Proben gegeben (siehe Kap. 3.2.6). Die angefärbte Nukleinsäure wurde auf einem UV-Transilluminator ($\lambda = 330$ nm) betrachtet. Die Nachweisempfindlichkeit der Ethidiumbromidfärbung liegt bei ca. 50 ng pro Bande.

3.2.6 Northern-Analyse

Kapillartransfer von RNA (Northern-Transfer)

Der sogenannte Northern-Transfer ist ein Kapillartransfer-Verfahren zur Übertragung gel-elektrophoretisch aufgetrennter RNA auf eine Membran aus Nitrocellulose oder Nylon (Sambrook *et al.* 1989). Die in denaturierenden Agarose- oder Polyacrylamidgelen aufgetrennte RNA wurde unmittelbar nach der Elektrophorese in Gegenwart von $5 \times$ SSC-Puffer auf eine Nylonmembran („Hybond N“, AMERSHAM) übertragen. Der Kapillartransfer dauerte ca. 14–16 h. Nach dem Transfer wurde die auf der Nylonmembran haftende RNA mit UV-Licht (120 mJ) in einer UV-Crosslink-Apparatur („Stratalinker“, STRATAGENE) kovalent fixiert. Danach wurde die Membran entweder sofort für eine Hybridisierung verwendet oder zunächst in Frischhaltefolie bei 4 °C gelagert.

Hybridisierung mit ^{32}P -markierten Oligonukleotid-Sonden

Alle Hybridisierungen wurden in einem Hybridisierungssofen (Fa. BIOMETRA) in um die Längsachse rotierenden Glasflaschen durchgeführt. Dazu wurde die Nylonmembran mit der RNA-Seite nach innen auf eine Glaspipette aufgerollt und an der Innenwand der Glasröhre vorsichtig abgerollt. Nach Zugabe von ca. 8 – 10 ml Vorhybridisierungslösung erfolgte die Vorhybridisierung für mindestens 2 h im Hybridisierungssofen bei der gleichen Temperatur wie die anschließende Hybridisierung. Diese begann nach Hinzufügen der Sonde (ca. $2 \cdot 10^6$ cpm ^{32}P -markiertes Oligonukleotid) und dauerte 12 – 16 h. Danach wurden überschüssige sowie unspezifisch gebundene Sondenmoleküle durch dreimaliges halbstündiges Waschen mit jeweils ca. 50 ml Waschlösung entfernt.

(Vor-)Hybridisierungslösung	SSC-Puffer	$5 \times$
	SDS	7,5 % (w/v)
	Heringssperm-DNA	50 $\mu\text{g}/\text{ml}$
Waschlösung:	SSC-Puffer	$5 \times$
	SDS	0,1 % (w/v)

Die Hybridisierungstemperatur ist bei DNA-Oligonukleotiden stark von der Länge und der Sequenz abhängig; daher wurde die optimale Hybridisierungstemperatur mit Hilfe des Computerprogramms POLAND (<http://www.biophys.uni-duesseldorf.de/POLAND/>) anhand einer simulierten UV-Denaturierungskurve ermittelt. Als Hybridisierungstemperatur wurde eine Temperatur von 10 °C unterhalb des berechneten T_m -Wertes gewählt.

Entfernen gebundener Oligonukleotid-Sonden

Vor einer erneuten Hybridisierung mußte die zuvor gebundene Sonde möglichst vollständig von der auf der Nylonmembran fixierten RNA entfernt werden. Dazu wurde die Nylonmembran im Hybridisierungssofen dreimal bei 80 °C in ca. 50 ml destilliertem Wasser für jeweils 1 h gewaschen. Unter diesen Bedingungen ließen sich die verwendeten DNA-Oligonukleotide nahezu vollständig entfernen.

3.2.7 Autoradiographien

Autoradiographien dienten dem Nachweis der gebundenen ^{32}P -markierten Sonden in Northern-Analysen und radioaktiv markierter RNA in Polyacrylamidgelen. Dazu wurden Gel oder Membran in Polyethylenfolie eingeschweißt/eingeschlagen und in eine Expositionskassette gelegt, deren Wand mit einer Verstärkerfolie (CRONEX PLUS intensifying screen, DUPONT) beschichtet war. Die radioaktiven Signale wurden mittels eines Röntgenfilms (KODAK XAR) nachgewiesen, der zwischen Membran und Verstärkerfolie gelegt wurde. Die Expositionen erfolgten in der Regel bei -70 °C; bei sehr intensiven Signalen (mehr als 300 Bq / 10 cm² lt. Flächenzähler) oder für alle quantitativen Nachweise (siehe 3.2.8) wurde auf den Szintillationseffekt der Verstärkerfolie verzichtet und bei Raumtemperatur (Nylonmembranen) oder -20 °C (Polyacrylamidgele) exponiert. Nach der Exposition, deren Dauer von 30 min bis zu 14 Tagen – je nach Signalintensität – reichte, wurden die Röntgenfilme in Entwicklertanks (CRONEX TD und TF, DUPONT) entwickelt.

Quantifizierung von Autoradiographiesignalen

Die durch die radioaktiven Signale verursachten Schwärzungen auf den Röntgenfilmen wurden durch densitometrische Analyse der in TIFF-Bilder überführten Röntgenbilder (HEWLETT PACKARD ScanJet 4c/T Scanner). Die Intensität der Signale wurden mit Hilfe des Programms SCIONIMAGE (<http://www.scioncorp.com>) quantitativ bestimmt. Die Linearität der Intensitätsmessung wurde immer durch mitverarbeitete Eichreihen, d. h. RNA-Proben bekannter Menge, überprüft. Dabei wurden für die Auswertung auch u. U. jeweils mehrere Autoradiographien verschiedener Intensität verglichen, um zu gewährleisten, daß die Intensitäten der einzelnen Banden im linearen Detektionsbereich des Röntgenfilms liegen.

3.3 RNA-Zerfallsexperimente

3.3.1 mRNA-Abbau *in vivo*

Um die Halbwertszeit plastidärer mRNAs *in vivo* bestimmen zu können, wurde intaktes Pflanzengewebe mit dem Transkriptionsinhibitor Actinomycin D behandelt (Klafl & Grissem, 1991). Actinomycin D ist ein pleiotrop wirkender Inhibitor sämtlicher in der Pflanzenzelle ablaufender Transkriptionsprozesse -aus diesem Grund ist bei längeren Inkubationszeiten mit der Beeinträchtigung des gesamten Zellstoffwechsels und daher massiven Störeffekten auf den natürlichen mRNA-Abbau zu rechnen. Bisherige Erfahrungen zeigen jedoch, daß Actinomycin D dennoch als Transkriptionsinhibitor in Pflanzen eingesetzt werden kann, wenn die Inkubationszeiten kurz genug sind, um Nebenwirkungen zu vermeiden (Klafl & Grissem, 1991; Ylstra & McCormick, 1999).

Arabidopsis thaliana

Etwa sechs Wochen alte Pflanzen wurden aus der Kulturschale genommen und unter Wasser vorsichtig von anhaftender Erde befreit. Dann wurden unter Wasser die Wurzeln mit einem Skalpell abgeschnitten und je ca. 10 – 20 Pflanzen in eine Petrischale (Durchmesser 10 cm) gesetzt, in der 10 ml 200 μ M Actinomycin D in Leitungswasser vorgelegt waren. Zur Kontrolle wurden immer jeweils eine gleiche Anzahl Pflanzen in Petrischalen mit Leitungswasser überführt. Die nun folgende Inkubation der Pflanzen erfolgte auf der Laborbank unter kontinuierlicher Beleuchtung (Philips SON-T 400 Natriumdampf-Hochdrucklampe) bei 23 – 25 °C. Zunächst wurden die Pflanzen bis zur annähernd vollständigen Verteilung des Actinomycin D im Blattgewebe vorinkubiert (ca. 30 min). Dann erfolgte in geeigneten Zeitabständen (vgl. Ergebnisse) die Probenentnahme: Je ca. 15 Pflanzen wurden vorsichtig auf Papierhandtüchern abgetrocknet und dann sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und zwecks späterer RNA-Präparation (Kap. 3.2.3 A) bei –70 °C gelagert.

Nicotiana tabacum

Von etwa zwei Monate alten Tabakpflanzen wurden reife expandierte Blätter (ca. 10 – 15 cm lang) mit einer Rasierklinge unter Wasser abgeschnitten und die Blattstiele in 200 μ M Actinomycin D (in Leitungswasser) getaucht. Kontrollblätter wurden gleich behandelt, aber in Leitungswasser getaucht. Die Inkubation mit dem Transkriptionsinhibitor erfolgte im Gewächshaus bei 25 °C und Dauerbeleuchtung (Philips SON-T 400 Natriumdampf-Hochdrucklampen). Es fand zunächst eine 30-minütige Vorinkubation statt. Dann wurden in geeigneten Zeitabständen Blätter in flüssigem Stickstoff eingefroren bis zur RNA-Isolation (Kap. 3.2.3 A) und bei –70 °C aufbewahrt.

3.3.2 mRNA-Abbau *in organello*

Frisch isolierte Chloroplasten aus reifen Spinatblättern wurden in Extraktpuffer (siehe Kap. 3.1.1, Zusatz von 10 mM MgCl₂) zu einer Konzentration von ca. $10^8 - 10^9$ Organellen pro ml aufgenommen und zunächst auf Eis gekühlt, um physiologische Prozesse – und insbesondere den RNA-Abbau – anzuhalten. Höchstens $\frac{1}{2}$ Std. nach Isolierung der Chloroplasten wurde die Organellsuspension in 12 ml-Kunststoffzentrifugenröhrchen auf die Laborbank gebracht und dort bei Raumtemperatur (23 °C) inkubiert. In geeigneten Zeitabständen (0 bis 9 Stunden nach Beginn der Inkubation) wurden Proben der Chloroplastensuspension entnommen und die RNA daraus nach Kap. 3.2.3 B präpariert.

3.3.3 *in-vitro*-RNA-Zerfallsystem

Als *in-vitro*-RNA-Zerfallsystem dienten lysierte Chloroplasten aus reifen Spinatblättern. Nach Lysieren der präparierten Chloroplasten findet keine Neuinitiation der Transkription mehr statt (Gruissem *et al.*, 1986), die Chloroplasten sind aber nach der angewandten Lysis-Methode in ihrer Feinstruktur nicht vollkommen zerstört und physiologisch noch einige Stunden funktionsfähig. Man kann in frisch lysierten (oder in „frisch“ aufgetauten) Chloroplasten den spezifischen Abbau der internen RNA-Spezies verfolgen. Um einheitliche Bedingungen zu erreichen, wurden im Rahmen dieser Arbeit alle *in-vitro*-RNA-Zerfallsexperimente mit Chloroplastenlysat durchgeführt, das genau einmal eingefroren war. Die Chloroplastensuspension wurde nach dem Auftauen auf Eis auf der Laborbank bei 23 °C stehen gelassen; in geeigneten Zeitabständen (0 bis zu 180 Minuten nach Auftauen) wurden Proben der Chloroplasten entnommen und sofort einer RNA-Präparation (Kap. 3.2.3 B) unterzogen. Für die Untersuchung des Abbaus von extern zugesetzten ³²P-markierten *in-vitro*-Transkripten wurde ähnlich verfahren. Hier wurde die Zerfallsreaktion nicht durch das Auftauen des Chloroplastenlysates, sondern durch Zugabe der markierten RNA gestartet.

3.4 Computer-Simulationen

3.4.1 Vorhersage konservierter RNA-Sekundärstruktur

Die Vorhersage von konservierten Sekundärstrukturen innerhalb der *psbA*- und *rbcL*-mRNAs in Chloroplasten von Angiospermen wurde mit Hilfe des Programms CONSTRUCT durchgeführt (Lück *et al.*, 1996, Lück *et al.*, 1999). Dieses Programm kombiniert eine Sekundärstrukturvorhersage aufgrund thermodynamischer Parameter mit einem klassischen Sequenz-Alignment und benötigt für signifikante Aussagen über konservierte Strukturelemente eine geringere Zahl von Sequenzen als Programme, die allein den Sequenzvergleich zur Identifizierung von konservierten Strukturen nutzen. Im letzteren Fall ist eine hohe Anzahl von

Einzelsequenzen notwendig, um über kompensatorische Basenaustausche signifikante Information über konservierte Strukturen zu erlangen.

Das Erstellen einer Consensus-Sekundärstruktur für die *psbA*- und *rbcL*-mRNA erfolgte folgendermaßen:

- CONSTRUCT verwendet das Programm RNAFOLD (Hofacker *et al.*, 1994; <http://www.tbi.univie.ac.at/~ivo/RNA/>), um für jede Einzelsequenz auf Basis thermodynamischer Parameter (Energieminimierung) eine Basenpaarwahrscheinlichkeitsmatrix zu erzeugen. Dabei wird für jede Sequenz R_k mit der Sequenzlänge n_k eines Satzes homologer Sequenzen $R_1 \dots R_M$ eine zweidimensionale Wahrscheinlichkeitsmatrix $n_k \times n_k$ erstellt. RNAfold erstellt die gesamte Strukturverteilung und legt sie an der Matrix ab. Die Basenpaarwahrscheinlichkeitsmatrix zeigen die thermodynamische Gewichtung alternativer Strukturen.
- Mit dem Programm CLUSTALX (<ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/software/unix/clustalw/clustalx>) wird für den Satz homologer Sequenzen ein Sequenzalignment unter Standardbedingungen erstellt. Dabei besitzen die Sequenzen nun die gleiche Länge N , die aufgrund des Einführens von Lücken größer ist, als die Länge n_k der Einzelsequenz. Anhand des Sequenzalignments kann mit dem Programm GENEDOC (<http://www.psc.edu/biomed/genedoc/>) die Sequenzhomologie bestimmt werden.
- Nun werden anhand des Sequenzalignments Lücken in die Basenpaarmatrizen eingeführt; dadurch werden ausgerichtete Basenpaarmatrizen der Länge $N \times N$ Nukleotide erzeugt. Homologe Basenpaare sollten sich nun bereits an derselben Position befinden, allerdings wird hier nur eine Ausrichtung auf Basis der Nukleotidsequenz, d. h. der *Primärstruktur*, durchgeführt und nicht auf Basis der *Sekundärstruktur*.
- Im nächsten Schritt werden die einzelnen ausgerichteten Basenpaarwahrscheinlichkeitsmatrizen aufsummiert. Dabei summieren sich die Basenpaarwahrscheinlichkeiten $p_k(i, j)$ jeder Einzelsequenz k zur „konservierten Basenpaar-Wahrscheinlichkeit“ $p_c(i, j)$:

$$p_c(i, j) = \left(\frac{\sum_{k=1}^M w_k \cdot p_k(i, j)^{\frac{1}{a}}}{\sum_{k=1}^M w_k} \right)^b$$

Der Faktor w_k erlaubt die Gewichtung der Einzelsequenzen, um z. B. zu verhindern, daß innerhalb eines Satzes homologer Sequenzen eine überproportional häufige Verwandtschaftsgruppe die Consensusstruktur dominiert. Die Exponenten $\frac{1}{a}$ und b ermöglichen die Unterdrückung individueller zugunsten konservierter Wahrscheinlichkeitswerte innerhalb der Matrix.

- Aus der Consensus-Basenpaar-Wahrscheinlichkeitsmatrix kann nun eine Consensusstruktur erzeugt werden. Mittels einer grafischen Benutzeroberfläche ermöglicht das Pro-

gramm CONSTRUCT interaktiv in das Sequenzalignment einzugreifen, um in Einzelsequenzen gegeneinander verschobene Strukturelemente in die gleiche Position zu bringen, d. h. das Alignment hinsichtlich konservierter *Strukturmotive* und zu Lasten konservierter *Sequenzmotive* zu optimieren (Details: siehe Ergebnisse). Die Ausgabe der Consensus-Struktur kann auf dreierlei Weise erfolgen: CONSTRUCTALIGN ist eine Darstellung des Sequenzalignments, wobei die konservierten Sekundärstrukturen rötlich hervorgehoben werden, außerdem wird auch die Consensus-Sequenz angegeben. DRAW-STRUCTURE ist eine graphische Ausgabe der Sekundärstruktur in konventioneller Darstellung. CIRCLES ist eine ringförmige Darstellung der Nukleotidsequenz, bei der die basenpaarenden Nukleotide durch Bögen verbunden werden.

- Das Pogramm CONSTRUCT ist erhältlich unter `ftp://ftp.biophys.uni-duesseldorf.de/pub/ConStruct/`.

Kapitel 4

Ergebnisse

4.1 Plastidäre mRNA-Stabilität *in vivo*

4.1.1 Voraussetzungen und Grundlagen

Die Bestimmung der *in vivo*-Halbwertszeiten von mRNAs des Chloroplasten bei Tabak und *Arabidopsis* sollte Informationen über die Charakteristika des mRNA-Metabolismus in zwei „Modellpflanzen“ liefern: Tabak ist zur Zeit die einzige höhere Pflanze, die die routineartige Herstellung transplastomischer Linien erlaubt (Svab *et al.*, 1990), *Arabidopsis* eignet sich besonders für genetische Analysen kernkodierter Faktoren der plastidären Genexpression. Für Tabak sollten die Messungen plastidärer mRNA-Stabilitäten in im Gewächshaus kultivierten Pflanzen Aufschluß darüber geben, inwieweit der mRNA-Metabolismus der Chloroplasten durch die Differenzierung des Blattgewebes beeinflusst wird. – Bisher lagen für Tabak ausschließlich Daten über die Halbwertszeiten plastidärer mRNAs in sterilen *in vitro* kultivierten Pflanzen sowie Mesophyllprotoplasten vor (Horlitz, 1995). Das Prinzip der Messung von plastidären mRNA-Halbwertszeiten *in vivo* bei Tabak- und *Arabidopsis*-Pflanzen beruht auf der schnellen Aufnahme des Transkriptionsinhibitors Actinomycin D in das Blattgewebe. Dabei sollte die Zeit bis zur annähernd vollständigen Verteilung des Inhibitors im Gewebe klein gegenüber den zu erwartenden RNA-Halbwertszeiten sein. In früheren Untersuchungen (Horlitz, 1995) hatte sich bereits gezeigt, daß eine Vorinkubation von 30 Minuten in Actinomycin D-Lösung ausreicht, um eine gleichmäßige Verteilung des Transkriptionsinhibitors im Blattgewebe zu gewährleisten. Actinomycin D ist ein pleiotrop wirkender Transkriptionshemmstoff, der auf sämtliche Transkriptionsprozesse in einer Zelle einwirkt, da er in die DNA-Doppelhelix interkaliert. Aus diesem Grund ist bei längerer Inkubation von intakten Pflanzen oder Blättern mit Nebenwirkungen des Inhibitors zu rechnen. Tatsächlich traten im Fall von Tabak bei Inkubationszeiten von mehr als zwölf Stunden deutlich sichtbare Gewebeschäden auf; bei *Arabidopsis* zeigten sich derartige Effekte erst nach Einwirkzeiten von mehr

als 18 Stunden. Die Zeitbereiche der RNA-Zerfallsmessungen wurden daher entsprechend begrenzt, unter der Annahme, daß bei Meßzeiten von 12 bzw. 18 Stunden die begleitenden – makroskopisch unsichtbaren – Nebenwirkungen des Actinomycin D vernachlässigbar waren (Klaff & Gruissem, 1991; Ylstra & McCormick, 1999; Horlitz, 1995).

Northern-Analysen und untersuchte mRNAs

Die quantitativen Northern-Analysen zur RNA-Stabilitätsmessung wurden mit 10 – 20 µg zellulärer Gesamt-RNA (spektralphotometrisch bestimmt) pro Einzelprobe bzw. pro Spur im denaturierenden Agarosegel durchgeführt. Die RNA-Mengen der Einzelproben eines Zerfallsexperimentes waren jeweils gleich. Die RNA-Präparationen aus den Gewebeproben lieferten 50 – 200 µg Gesamt-RNA, so daß mehrfache Northern-Analysen derselben RNA-Zerfallsreihe zur Absicherung der gemessenen RNA-Halbwertszeiten möglich waren. Im Detail wurde so verfahren, daß jeweils die Proben einer RNA-Zerfallsreihe (Zugabe von Actinomycin D) zusammen mit einer entsprechenden Kontrollreihe und einem RNA-Mengenstandard im selben Agarosegel aufgetrennt und auf dieselbe Nylonmembran transferiert wurden. Damit fanden die folgenden Hybridisierungen mit spezifischen Sonden und die Autoradiographien für die Zerfalls-, Kontroll- und Standardreihen unter identischen Bedingungen statt. Die Signalintensitäten des RNA-Mengenstandards stellten sicher, daß die Hybridisierungen quantitativ waren und die gemessenen Intensitätswerte der RNA-Zerfalls- und Kontrollreihen im linearen Nachweisbereich der Autoradiographien lagen. Alle Nylonmembranen wurden nacheinander, niemals gleichzeitig, mit verschiedenen Oligonukleotidsonden hybridisiert, wobei jeweils die zuvor gebundene Sonde entfernt wurde.

Im Rahmen der mRNA-Zerfallsexperimente wurden folgende RNA-Spezies untersucht:

- 16S-rRNA: Nachgewiesen wurde die Volllänge des reifen prozessierten RNA (Tabak und *Arabidopsis*: 1489 nt). Als stabilste RNA diente sie zur Standardisierung im Rahmen der quantitativen Northern-Analysen
- *psbA*-mRNA: Hier wurde die intakte monocistronische mRNA nachgewiesen (Tabak: 1239 nt, *Arabidopsis*: 1238 nt).
- *rbcL*-mRNA: Diese ebenfalls monocistronische mRNA besitzt in Tabak eine Länge von 1757 nt, bei *Arabidopsis* 1708 nt.
- *psaA-psaB-rps14*-mRNA: Diese tricistronische mRNA stellt das Transkript des *psaA*-Operons dar (Meng *et al.*, 1988; Westhoff *et al.*, 1983), entsprechend wurde in der Northern-Analyse diese ca. 5 kb große mRNA nachgewiesen.
- *atpB-atpE*-mRNA: Die etwa 3 kb große dicistronische mRNA liegt *in vivo* in mehreren Varianten mit unterschiedlichen 5'-Enden vor (Orozco *et al.*, 1990). In Falle von Tabak

konnten diese Varianten nicht einzeln im Agarosegel aufgelöst werden; sie erschienen vielmehr als eine diffuse Bande (s. u.). Bei *Arabidopsis* konnten zwei mRNA-Varianten nachgewiesen werden.

Auf die Analyse polycistronischer mRNAs, die einer komplexen Prozessierung unterliegen (Beispiel: *psbB*-Operon, Tanaka *et al.*, 1987; Westhoff *et al.*, 1985) wurde verzichtet, da in einem solchen Fall die Prozesse der RNA-Prozessierung und des RNA-Abbaus ineinandergreifen. Eine getrennte Untersuchung der mRNA-Stabilität ist dabei ohne weiteres nicht möglich.

Annahmen zur Kinetik des mRNA-Abbaus

Um die Lebensdauer bzw. Halbwertszeit von mRNAs aus den quantitativen Northern-Analysen bestimmen zu können, wurden einige Annahmen zum Mechanismus des mRNA-Abbaus unter den vorliegenden experimentellen Bedingungen zugrunde gelegt:

Als mRNA-Abbau wird hier die Abnahme des Spiegels der mRNA-Vollänge angesehen, wie sie in der Northern-Analyse nachgewiesen werden kann; dies gilt sowohl für mono- als auch für polycistronische mRNA-Spezies.

erster Reaktionsschritt:



Diese Reaktionsgleichung gilt sowohl für endonukleolytischen als auch für exonukleolytischen Abbau der mRNA; im letzteren Fall kann ein Zerfallsfragment auch ein Mononukleotid sein. Die Zerfallsreaktion wird durch diverse Proteine vermittelt/katalysiert, deren Aktivität über den Zeitraum der experimentellen Betrachtung als konstant angesehen wird¹. Da auch die Konzentration des Reaktionspartners H₂O im wäßrigen Milieu des Chloroplasten als konstant angenommen werden kann, läßt sich der mRNA-Zerfall als Reaktion pseudo-erster Ordnung beschreiben:

$$v_{\text{Zerfall}} = k \cdot [\text{mRNA}]$$

Die Zerfallsgeschwindigkeit ist der Konzentration der intakten mRNA proportional. Für die mRNA-Konzentration zur Zeit *t* gilt:

$$[\text{mRNA}]_t = [\text{mRNA}]_0 \cdot e^{-k \cdot t} \Leftrightarrow \ln \frac{[\text{mRNA}]_t}{[\text{mRNA}]_0} = -k \cdot t$$

Die Halbwertszeit $t_{\frac{1}{2}}$ der mRNA (also die Zeit, in der die Konzentration der mRNA auf die Hälfte ihres Ausgangswertes sinkt) ist in der hier angenommenen Reaktion pseudo-erster Ordnung eine charakteristische Größe der Reaktion und nur von der Geschwindigkeitskonstante *k* abhängig.

¹Die mögliche Verarmung von bestimmten Proteinen als Nebenwirkung des Actinomycin D wird hier vernachlässigt.

$$k \cdot t_{\frac{1}{2}} = \ln \frac{[mRNA]_0}{\frac{1}{2}[mRNA]_0} = \ln \frac{1}{\frac{1}{2}} = \ln 2$$

$$t_{\frac{1}{2}} = \frac{\ln 2}{k}$$

Auf der Grundlage dieser Annahmen wurden die mRNA-Zerfallsexperimente folgendermaßen ausgewertet: Die jeweils anhand der Signalintensitäten in der Northern-Analyse bestimmten mRNA-Mengen wurden für jeden Zeitpunkt der RNA-Zerfallreihe zu der entsprechenden Menge der 16S-rRNA ins Verhältnis gesetzt. Die so erhaltenen gegen 16S-rRNA standardisierten mRNA-Mengen wurden in Prozent des Anfangswertes (100 % für $t = 0$) ausgedrückt, um anschauliche Zahlenwerte zu erhalten. In einem RNA-Menge/Zeit-Diagramm wurden den Meßwerten Exponentialfunktionen gemäß der angenommenen Kinetik angepaßt, aus denen dann über die Zerfallskonstanten k die Halbwertszeiten $t_{\frac{1}{2}}$ berechnet wurden.

Die 16S-rRNA wurde als Mengenstandard gewählt, um etwaige Unterschiede in den pro Zeitpunkt analysierten Gesamt-RNA-Mengen auszugleichen. Darüberhinaus besitzt sie die größte *in-vivo*-Stabilität der bisher untersuchten plastidären mRNAs (Klafl & Gruissem, 1991; Kim *et al.*, 1993).

4.1.2 Plastidäre mRNA-Stabilität in Tabak

Reife expandierte Tabakblätter wurden nach vier Stunden Vorbelichtung mit 200 μ M Actinomycin D in Leitungswasser für 30 Minuten vorbehandelt (Kontrolle: reines Leitungswasser). Die RNA-Spiegel wurden zu folgenden Zeitpunkten bestimmt: 0 h (Start der Messung), 1 h, 3 h, 5 h, 8 h, 12 h. Als RNA-Mengenstandard dienten Proben zu 20 μ g, 15 μ g, 10 μ g und 5 μ g Gesamt-RNA.

Die **16S-rRNA** (**Abb. 4.1**) zeigt weitgehend konstante Signalintensitäten über den gesamten Meßzeitraum. Dies gilt sowohl für die RNA-Zerfallsreihe in Anwesenheit von Actinomycin D, als auch für die Kontrollreihe. Damit ist ein signifikanter Abbau der 16S-rRNA während der Dauer des Experimentes nicht nachweisbar, wie es die Verwendung dieser RNA als Standard für die Bestimmung von Halbwertszeiten anderer RNA-Spezies erfordert.

Die ***psbA*-mRNA** (**Abb. 4.2**) zeigt ebenfalls weitgehend konstante Spiegel im Verlauf der Actinomycin D-Behandlung, wie auch in der Kontrollreihe. Ein spezifischer Zerfall ist nicht zu beobachten; vergleicht man die Signalintensitäten der *psbA*-mRNA mit denen der 16S-rRNA, so ergibt sich eine Halbwertszeit, die ein Vielfaches des Meßzeitraums beträgt. Die Halbwertszeit der *psbA*-mRNA dürfte damit bei deutlich mehr als 50 Stunden liegen.

Bei der ***rbcL*-mRNA** (**Abb. 4.2**) läßt sich eine leichte zeitliche Abnahme der Signalintensität unter Actinomycin D-Einwirkung nachweisen, während die Signalintensitäten in der Kontrollreihe weitgehend zeitlich konstant sind. Nach Standardisierung der Intensitätswerte

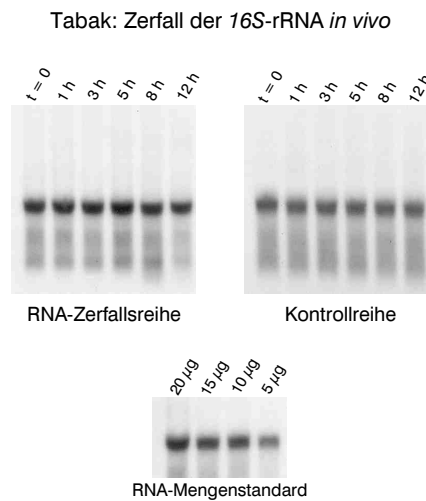


Abbildung 4.1: **Tabak — Zerfall der 16S-rRNA *in vivo***. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der 16S-rRNA-Spiegel im RNA-Zerfallsexperiment als Ergebnis der Northern-Analyse. Die RNA-Spiegel wurden in intakten Blättern nach Hemmung der Transkription mit 200 μ M Actinomycin D beobachtet; als Kontrolle diente Leitungswasser. Pro Spur wurden 20 μ g Gesamt-RNA eingesetzt. Die Intensitäten der 16S-rRNA-Banden wurden quantitativ bestimmt (siehe Kap. 3.2.7) und dienten als Standard für die mRNA-Zerfallsanalysen (siehe Abb. 4.2, 4.3).

der *rbcL*-mRNA gegen die 16S-rRNA-Werte ergibt sich für die *rbcL*-mRNA eine Halbwertszeit von $25,2 \pm 5,6$ Stunden.

Die *psaA/B-rps14*-mRNA (Abb. 4.3) zeigt in der RNA-Zerfallsreihe eine im Verlauf von 12 Stunden deutlich abnehmende Signalintensität: Bei $t = 12$ h ist die mRNA-Volllänge kaum noch detektierbar, während in der Kontrollreihe keine deutliche Abnahme des RNA-Spiegels sichtbar ist. Nach Standardisierung ergibt sich für diese mRNA eine Halbwertszeit von $4,5 \pm 0,7$ Stunden.

Im Fall der *atpB/E*-mRNA (Abb. 4.3) ist ebenso eine deutliche Abnahme des RNA-Spiegels im Verlauf der Actinomycin D-Behandlung zu beobachten. Die Signale in der Kontrollreihe zeigen hingegen nur eine sehr schwach abnehmende Tendenz. Im Vergleich mit der 16S-rRNA läßt sich für die *atpB/E*-mRNA eine Halbwertszeit von $8,0 \pm 2,3$ Stunden ermitteln. Bei dieser mRNA ist zu beachten, daß sie *in vivo* ein heterogenes 5'-Ende besitzt. Bei Tabak können bis zu sechs Varianten unterschieden werden, die jeweils von verschiedenen Promotoren transkribiert werden, also keine Prozessierungsprodukte sind (Orozco *et al.*, 1990). Da in den verwendeten Agarosegelen die Größenunterschiede der *atpB/E*-mRNA-Varianten nicht aufgelöst werden, wurde hier anhand der sichtbaren etwas diffusen Bande die mittlere Halbwertszeit aller mRNA-Varianten bestimmt.

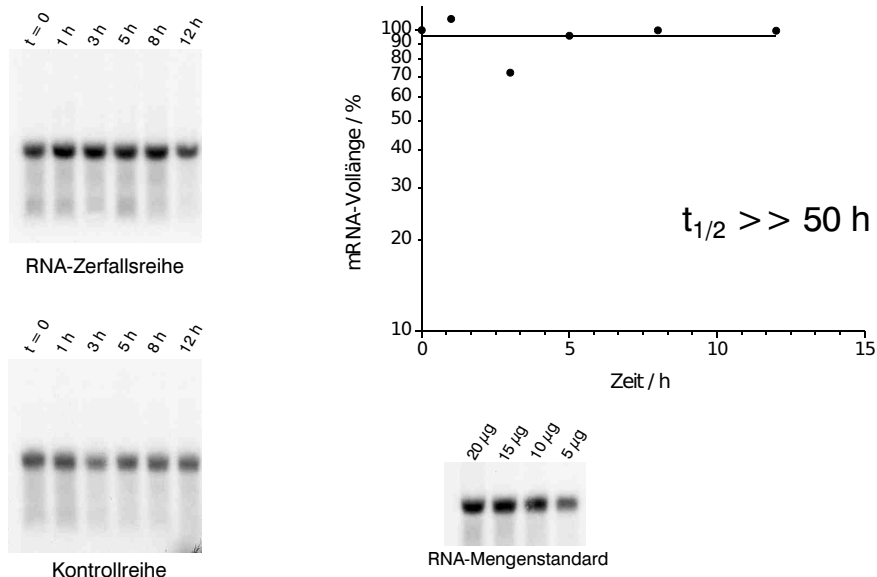
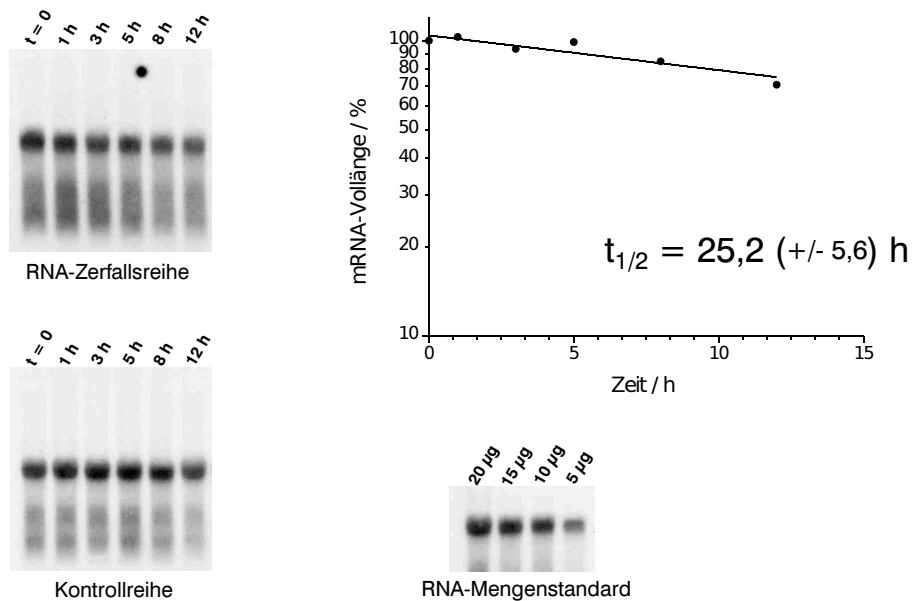
Tabak: Zerfall der *psbA*-mRNA *in vivo*Tabak: Zerfall der *rbcL*-mRNA *in vivo*

Abbildung 4.2: **Tabak — Zerfall der *psbA*-mRNA und *rbcL*-mRNA *in vivo*.** Linke Seite: Zeitlicher Verlauf der Signalintensitäten der jeweiligen mRNA in der Northern-Analyse (20 µg RNA/Spur) - RNA-Zerfallsreihe: Hemmung der Transkription mit 200 µM Actinomycin D / Kontrollreihe: Inkubation in Leitungswasser. Rechte Seite: Die jeweiligen mRNA-Mengen wurden für jeden Zeitpunkt gegen die entsprechenden 16S-rRNA-Mengen standardisiert und gegen die Zeit aufgetragen. Den Meßwerten wurde eine Exponentialfunktion ($[mRNA]_t = [mRNA]_0 \cdot e^{-k \cdot t}$) gemäß der theoretischen Ableitung in Kap. 4.1 angepaßt; aus dieser wurde die Halbwertszeit der mRNA bestimmt.

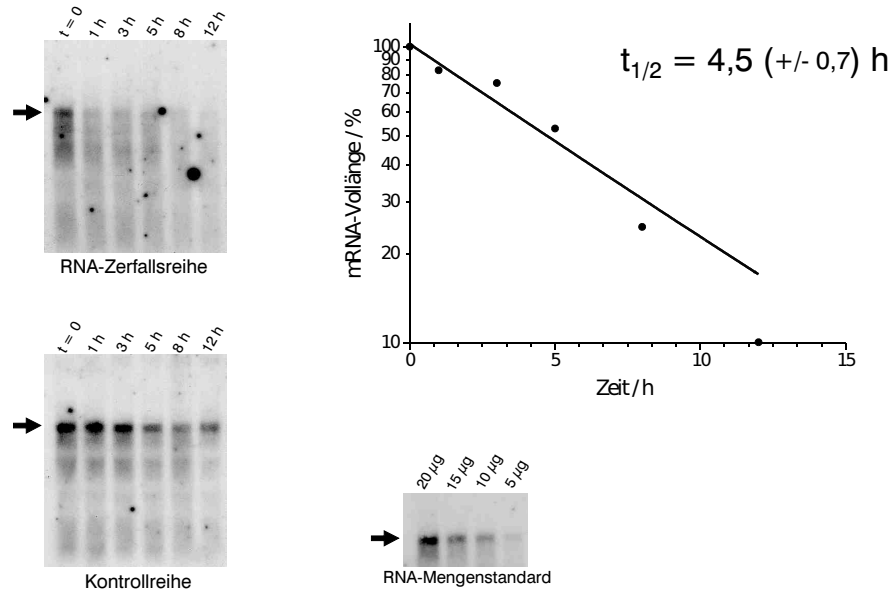
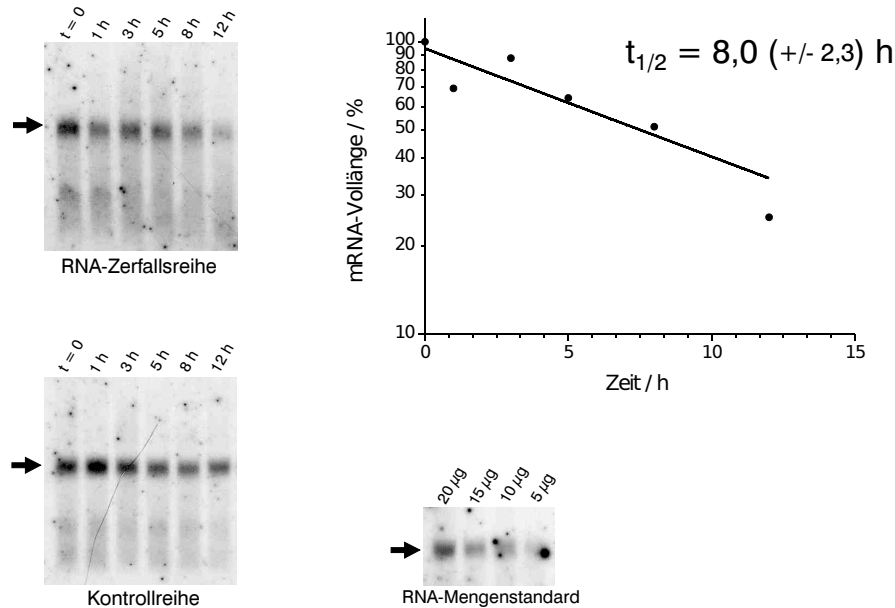
Tabak: Zerfall der *psaA/B-rps14*-mRNA *in vivo*Tabak: Zerfall der *atpB/E*-mRNA *in vivo*

Abbildung 4.3: **Tabak** — Zerfall der *psaA/B-rps14*-mRNA und *atpB/E*-mRNA *in vivo*. Linke Seite: Zeitlicher Verlauf der Signalintensitäten der jeweiligen mRNA in der Northern-Analyse (20 µg RNA/Spur) - RNA-Zerfallsreihe: Hemmung der Transkription mit 200 µM Actinomycin D / Kontrollreihe: Inkubation in Leitungswasser (Pfeil: Position der mRNA-Vollänge). Rechte Seite: Die jeweiligen mRNA-Mengen wurden für jeden Zeitpunkt gegen die entsprechenden 16S-rRNA-Mengen standardisiert und gegen die Zeit aufgetragen. Den Meßwerten wurde eine Exponentialfunktion ($[mRNA]_t = [mRNA]_0 \cdot e^{-k \cdot t}$) gemäß der theoretischen Ableitung in Kap. 4.1 angepaßt; aus dieser wurde die Halbwertszeit der mRNA bestimmt.

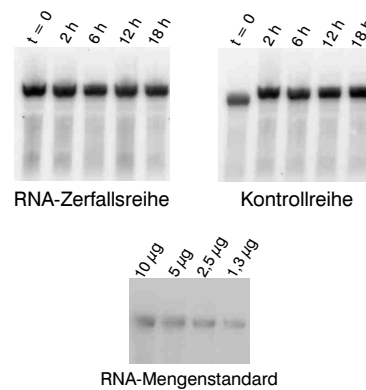
4.1.3 Plastidäre mRNA-Stabilität in *Arabidopsis**Arabidopsis*: Zerfall der 16S-rRNA *in vivo*

Abbildung 4.4: *Arabidopsis* — Zerfall der 16S-rRNA *in vivo*. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der 16S-rRNA-Spiegel im RNA-Zerfallsexperiment als Ergebnis der Northern-Analyse. Die RNA-Spiegel wurden in intakten Blättern nach Hemmung der Transkription mit 200 μ M Actinomycin D beobachtet; als Kontrolle diente Leitungswasser. Pro Spur wurden 10 μ g Gesamt-RNA eingesetzt. Die Intensitäten der 16S-rRNA-Banden wurden quantitativ bestimmt (siehe Kap. 3.2.7) und dienten als Standard für die mRNA-Zerfallsanalysen (siehe Abb. 4.5, 4.6).

Ganze *Arabidopsis*-Blattrosetten wurden nach vier Stunden Vorbelichtung mit 200 μ M Actinomycin D in Leitungswasser für 30 Minuten vorinkubiert (Kontrolle: reines Leitungswasser). Unmittelbar danach wurden zu folgenden Zeitpunkten die RNA-Spiegel bestimmt: 0 h (Start der Messung), 2 h, 6 h, 12h, 18 h. Für eine Einzelprobe wurden 10 μ g Gesamt-RNA in der Northern-Analyse eingesetzt. Als RNA-Mengenstandard dienten Proben zu 10 μ g, 5 μ g, 2,5 μ g und 1,3 μ g Gesamt-RNA.

Die **16S-rRNA** (Abb. 4.4) zeigt weitgehend konstante RNA-Spiegel über den gesamten Meßzeitraum. Dies gilt sowohl für die RNA-Zerfallsreihe in Anwesenheit von Actinomycin D, als auch für die Kontrollreihe. Ein Abbau der 16S-rRNA während der Dauer des Experimentes ist nicht nachweisbar, wie es die Verwendung dieser RNA als Standard für die Bestimmung von Halbwertszeiten anderer RNA-Spezies verlangt.

Die ***psbA*-mRNA** (Abb. 4.5) zeigt ebenfalls weitgehend konstante Spiegel im Verlauf der Actinomycin D-Behandlung, wie auch in der Kontrollreihe. Ein spezifischer Zerfall ist nicht zu beobachten; vergleicht man die Signalintensitäten der *psbA*-mRNA mit denen der 16S-rRNA, so ergibt sich eine Halbwertszeit, die ein Vielfaches des Meßzeitraums beträgt. Die Halbwertszeit der *psbA*-mRNA dürfte damit – ähnlich wie bei Tabak – bei deutlich mehr als

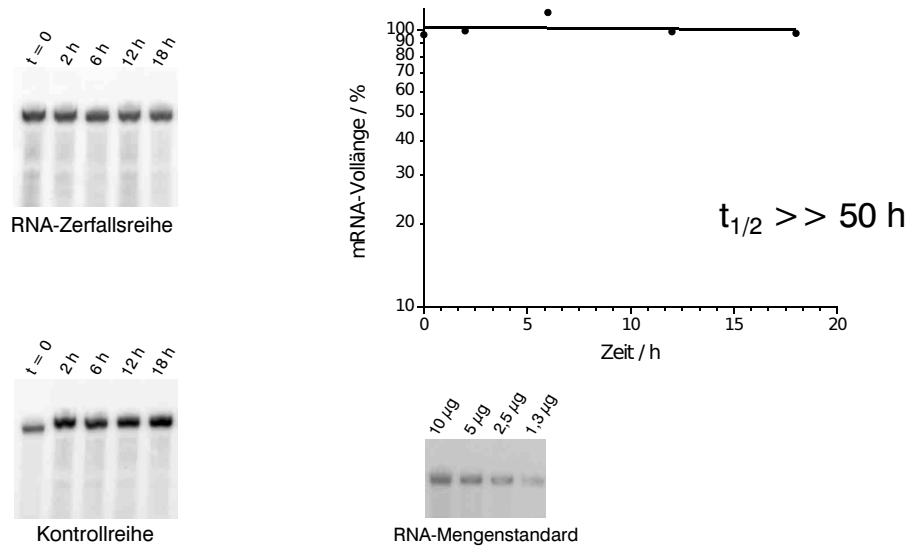
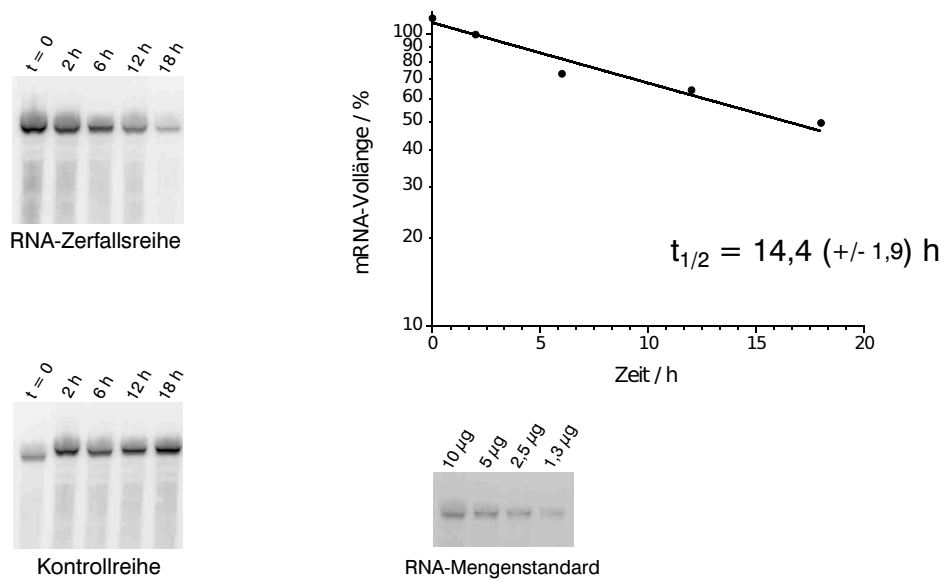
Arabidopsis: Zerfall der *psbA*-mRNA *in vivo**Arabidopsis*: Zerfall der *rbcL*-mRNA *in vivo*

Abbildung 4.5: *Arabidopsis* — Zerfall der *psbA*-mRNA und *rbcL*-mRNA *in vivo*. Linke Seite: Zeitlicher Verlauf der Signalintensitäten der jeweiligen mRNA in der Northern-Analyse (20 μ g RNA/Spur) – RNA-Zerfallsreihe: Hemmung der Transkription mit 200 μ M Actinomycin D / Kontrollreihe: Inkubation in Leitungswasser. Rechte Seite: Die jeweiligen mRNA-Mengen wurden für jeden Zeitpunkt gegen die entsprechenden 16S-rRNA-Mengen standardisiert und gegen die Zeit aufgetragen. Den Meßwerten wurde eine Exponentialfunktion ($[mRNA]_t = [mRNA]_0 \cdot e^{-k \cdot t}$) gemäß der theoretischen Ableitung in Kap. 4.1 angepaßt; aus dieser wurde die Halbwertszeit der mRNA bestimmt.

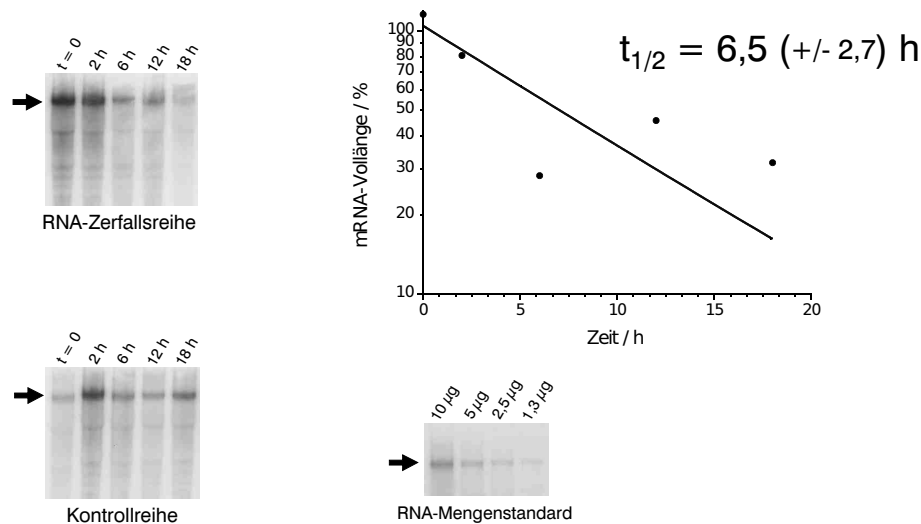
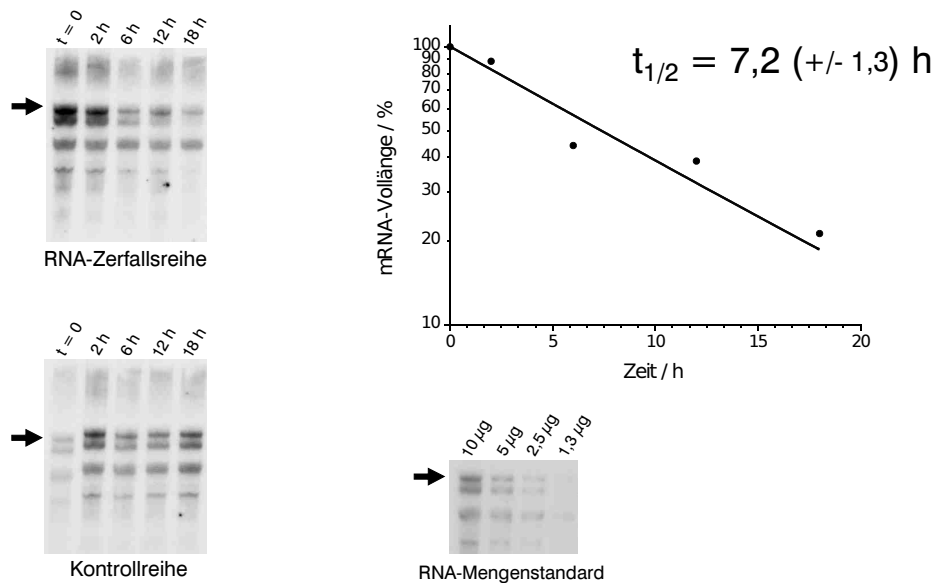
Arabidopsis: Zerfall der *psaA/B-rps14*-mRNA *in vivo**Arabidopsis*: Zerfall der *atpB/E*-mRNA *in vivo*

Abbildung 4.6: *Arabidopsis*— Zerfall der *psaA/B-rps14*-mRNA und *atpB/E*-mRNA *in vivo*. Linke Seite: Zeitlicher Verlauf der Signalintensitäten der jeweiligen mRNA in der Northern-Analyse (20 µg RNA/Spur) – RNA-Zerfallsreihe: Hemmung der Transkription mit 200 µM Actinomycin D / Kontrollreihe: Inkubation in Leitungswasser (Pfeil: Position der mRNA-Vollänge). Rechte Seite: Die jeweiligen mRNA-Mengen wurden für jeden Zeitpunkt gegen die entsprechenden 16S-rRNA-Mengen standardisiert und gegen die Zeit aufgetragen. Den Meßwerten wurde eine Exponentialfunktion ($[mRNA]_t = [mRNA]_0 \cdot e^{-k \cdot t}$) gemäß der theoretischen Ableitung in Kap. 4.1 angepaßt; aus dieser wurde die Halbwertszeit der mRNA bestimmt.

50 Stunden liegen.

Bei der ***rbcL*-mRNA** (Abb. 4.5) läßt sich eine leichte zeitliche Abnahme der Signalintensität unter Actinomycin D-Einwirkung nachweisen, während die Signalintensitäten in der Kontrollreihe weitgehend zeitlich konstant sind. Nach Standardisierung der Intensitätswerte der *rbcL*-mRNA gegen die 16S-rRNA-Werte ergibt sich für die *rbcL*-mRNA eine Halbwertszeit von $14,4 \pm 1,9$ Stunden; sie ist damit in *Arabidopsis* etwas instabiler als in Tabak.

Wie bei Tabak, so zeigt die ***psaA/B-rps14*-mRNA** (Abb. 4.6) auch bei *Arabidopsis* in der RNA-Zerfallsreihe eine im Verlauf von 12 Stunden deutlich abnehmende Signalintensität – bei $t = 12$ h ist die mRNA-Volllänge nur noch schwach detektierbar, während in der Kontrollreihe keine deutliche Abnahme des RNA-Spiegels zu erkennen ist. Nach Standardisierung ergibt sich für diese mRNA eine Halbwertszeit von $6,5 \pm 2,7$ Stunden. Wegen der Streuung der RNA-Intensitätswerte ist hier die Genauigkeit des $t_{\frac{1}{2}}$ -Wertes geringer als bei anderen mRNAs.

Die ***atpB/E*-mRNA** (Abb. 4.6) zeigt in der Northern-Analyse zwei Banden, die darauf zurückzuführen sind, daß diese mRNA *in vivo* ein heterogenes 5'-Ende besitzt (Orozko *et al.*, 1990). Da noch keine Klarheit darüber besteht, in welchem Maße die einzelnen mRNA-Varianten translatiert werden, also zur Synthese der Genprodukte beitragen, wird hier eine mittlere Halbwertszeit beider mRNA-Formen bestimmt. Für beide mRNA-Varianten ist eine deutliche Abnahme des RNA-Spiegels im Verlauf der Actinomycin D-Behandlung zu beobachten. Die Signale in der Kontrollreihe zeigen hingegen nur keine abnehmende Tendenz. Im Vergleich mit der 16S-rRNA läßt sich für die *atpB/E*-mRNA eine Halbwertszeit von $7,3 \pm 1,3$ Stunden ermitteln.

	<i>psbA</i>	<i>rbcL</i>	<i>psaA/B-rps14</i>	<i>atpB/E</i>
Tabak	$\gg 50$ h	$25,2 \pm 5,6$ h	$4,5 \pm 0,7$ h	$8,0 \pm 2,3$ h
<i>Arabidopsis</i>	$\gg 50$ h	$14,4 \pm 1,9$ h	$6,5 \pm 2,7$ h	$7,2 \pm 1,3$ h

Tabelle 4.1: *in vivo* bestimmte Halbwertszeiten von mRNAs reifer Chloroplasten

4.1.4 mRNA-Halbwertszeiten *in vivo* in Chloroplasten von Tabak und *Arabidopsis*

In Tabelle 4.1 sind die *in vivo* bestimmten Halbwertszeiten plastidärer mRNAs zusammengefaßt. Es läßt sich ablesen, daß die hier untersuchten mRNA-Spezies hinsichtlich ihrer Stabilität ähnliche Eigenschaften in beiden Pflanzenarten aufweisen. Dies gilt sowohl für die

Abstufung der mRNA-Stabilität in der Reihenfolge $psbA > rbcL > atpB/E > psaA/B-rps14$, als auch für die absoluten *in vivo*-Halbwertszeiten, die für die einzelnen mRNAs bei Tabak und *Arabidopsis* sehr ähnlich sind.

4.2 Konservierte mRNA-Sekundärstrukturen

Die Messungen der *in vivo*-mRNA-Stabilitäten von Chloroplasten-mRNAs, die im Rahmen dieser Arbeit in Tabak und *Arabidopsis* durchgeführt wurden, wie auch frühere Untersuchungen in Spinat (Klauff & Gruissem, 1991) und Gerste (Kim *et al.*, 1993) zeigen eine hohe Langlebigkeit der plastidären mRNAs. Auch die Abstufung der Stabilitäten verschiedener analysierter mRNA-Spezies ist bei den betrachteten Pflanzen weitgehend konserviert. Dies deutet darauf hin, daß der mRNA-Metabolismus der Chloroplasten bei den Angiospermen generell ähnliche Eigenschaften zeigt. Es gibt seit längerem starke Hinweise darauf, daß RNA-Strukturmotive für die Stabilität plastidärer mRNAs von großer Bedeutung sind (z. B. Schuster *et al.*, 1999). Dabei werden zum einen Haarnadel-Sekundärstrukturen in der 3'-untranslatierten Region einer mRNA diskutiert, die – neben einer Funktion als Prozessierungssignal – als Barriere für 3' → 5'-exonukleolytischen Abbau dienen. Zum anderen wird auch Strukturelementen in der 5'-untranslatierten Region eine Funktion bei der Regulation der mRNA-Stabilität zugeschrieben (Higgs *et al.*, 1999). Um der Frage nachzugehen, in welchen Maße Strukturelemente eine Bedeutung für die mRNA-Stabilität generell haben können, wurde bei mRNAs aus Chloroplasten höherer Pflanzen nach konservierten Sekundärstrukturmotiven gesucht; dabei wurde mit dem Programm CONSTRUCT eine Kombination aus Sequenzalignment und thermodynamischer Sekundärstrukturvorhersage angewandt. Dieser Ansatz ist hier die Methode der Wahl, da Aussagen über konservierte Strukturelemente auf der Basis der begrenzten Zahl von Sequenzen möglich sind, die für mRNAs aus Chloroplasten höherer Pflanzen zur Verfügung stehen.

4.2.1 Betrachtete mRNAs und verwendete Sequenzen

Der Auswahl der mRNAs des Chloroplasten, die auf konservierte Sekundärstrukturen untersucht werden sollten, lagen folgende Kriterien zugrunde:

- Die zu betrachtenden mRNAs sollten monocistronisch in Chloroplasten vorliegen. – Aussagen über mögliche Zusammenhänge zwischen RNA-Sekundärstruktur und RNA-Stabilität lassen sich leichter treffen, wenn die untersuchte mRNA einen möglichst einfachen funktionellen Aufbau zeigt. Das bedeutet, daß es sinnvoller ist, eine monocistronische mRNA zu betrachten als eine polycistronische, selbst wenn diese nicht prozessiert wird. Polycistronische mRNA besitzen für jede vorhandene kodierende Region spezielle *cis*-Elemente für die Translationsregulation, die sich nicht unbedingt *a priori* von

Signalen für die mRNA-Stabilität unterscheiden lassen; darüberhinaus können verschiedenen kodierende Regionen auf der selben mRNA Proteine mit fundamental verschiedenen biologischen Funktionen – und damit mit unterschiedlicher Translationskontrolle – kodieren, wie zum Beispiel bei der *psaA/B-rps14*-mRNA, bei der zwei Proteine des Photosystems I und eine ribosomales Protein von derselben RNA translatiert werden.

- Die Sequenzlänge der zu untersuchenden mRNAs soll unterhalb von 2000 nt liegen. Mit zunehmender Sequenzlänge N der RNA nimmt der Rechenaufwand mit N^2 zu. Abhängig von der Leistungsfähigkeit des verwendeten Rechners ist das ConStruct-Programm bei längeren Sequenzen nicht mehr sinnvoll anwendbar, da insbesondere die interaktive Veränderung des Sequenzalignments zur Optimierung der Consensus-Struktur, die über die graphische Oberfläche gesteuert wird, nicht mehr möglich ist.
- Verschiedene zu analysierende mRNAs sollten sich in der Kontrolle ihrer Stabilität unterscheiden, um regulatorisch bedeutsame Strukturelemente identifizieren zu können.
- Es sollten nur mRNA-Vollängensequenzen aus Angiospermen für die Analyse konservierter Sekundärstrukturen berücksichtigt werden. Die Regulation und Mechanismen des mRNA-Abbaus in höheren Pflanzen unterscheiden sich von der in Algen wie *Chlamydomonas*. Beispielsweise wurde in *Chlamydomonas* eine 5'→3'-Exonuklease als Komponente der plastidären mRNA-Degradationsmaschinerie beschrieben, für deren Existenz es in Angiospermen keine Hinweise gibt (Drager *et al.*, 1999; Schuster *et al.*, 1999).

Auf der Grundlage dieser Kriterien wurden für die Strukturvorhersage daher die *psbA*- und *rbcL*-mRNA herangezogen. Beide mRNAs werden in ihrer Stabilität unterschiedlich reguliert: Die Stabilität der *psbA*-mRNA nimmt in Spinat während der Chloroplastenreifung deutlich zu, während die *rbcL*-mRNA nur schwach stabilisiert wird (Klafl & Grissem, 1991). Beide mRNAs liegen monocistronisch im Chloroplasten vor und sind mit Größen von ca. 1250 nt (*psbA*) und ca. 1700 nt (*rbcL*) für das Programm CONSTRUCT gut handhabbar.

4.2.2 ConStruct-Rechnungen: Wahl der Parameter

Für die Identifizierung konservierter Strukturelemente müssen zunächst Basenpaarwahrscheinlichkeitsmatrizen für jede einzelne betrachtete Sequenz innerhalb eines Satzes homologer Sequenzen unter Anwendung des Programms csRNAfold berechnet werden (vgl. Kap. 3.4). Die Berechnungen von Sekundärstrukturen erfolgten unter Standardbedingungen des Programms, d. h. sie wurden für eine Temperatur von 25 °C durchgeführt; als kleinstmögliche Länge einer Helix wurden 2 bp gewählt, um das Auffinden von kleinen konservierten Strukturelementen nicht zu behindern.

Bei der Aufsummierung der einzelnen Basenpaarwahrscheinlichkeitsmatrizen eines Satzes homologer Sequenzen nach dem beschriebenen Algorithmus (Kap. 3.4) wird die Gewichtung der

Basenpaarwahrscheinlichkeiten der Einzelsequenzen durch die Wahl der Exponenten $\frac{1}{a}$ und b bestimmt. Der Exponent $\frac{1}{a}$ bestimmt die Gewichtung der Wahrscheinlichkeit von Basenpaaren innerhalb einer Einzelsequenz *vor* der Summierung zur konservierten Wahrscheinlichkeit. Für $a > 1$ werden Basenpaarungen verstärkt repräsentiert, die zwar jeweils keine sehr hohe Wahrscheinlichkeit in den Einzelsequenzen aufweisen, dafür aber in den meisten der betrachteten Sequenzen vorkommen, also konserviert sind. Für $0 < a < 1$ werden Helices mit niedriger Wahrscheinlichkeit unterdrückt. Der Parameter b bestimmt die Gewichtung von Strukturelementen innerhalb der Consensusstruktur *nach* der Aufsummierung. Die Wahl von $b > 1$ führt zur Unterdrückung von Helices mit geringer Wahrscheinlichkeit; für $0 < b < 1$ ergibt sich eine verstärkte Repräsentanz von Helices mit niedrigeren Basenpaarungswahrscheinlichkeiten innerhalb der konservierten Sekundärstruktur.

Für die Untersuchung möglicher konservierter Sekundärstruktur innerhalb der *psbA*- und *rbcL*-mRNA wurden folgende Parameter gewählt: Die Identifizierung konservierter Strukturelemente sollte sich auf Basenpaarungen stützen, die in den Einzelsequenzen eine hohe Wahrscheinlichkeit (d. h. eine hohe thermodynamische Stabilität) aufweisen. Dies wurde mit der Wahl von $a = 0,3$ gewährleistet. Bei der Berechnung der Consensus-Basenpaarwahrscheinlichkeiten wurde der Exponent b auf 0,5 festgesetzt, sodaß auch konservierte Helices mit mäßigeren Wahrscheinlichkeiten in der Consensusstruktur repräsentiert sein sollten (Lück *et al.*, 1996).

4.2.3 Konservierte Sekundärstrukturen der *psbA*-mRNA

In der GENBANK-Sequenzdatenbank fanden sich – wie in der Tabelle 4.2 aufgelistet – 17 Vollängen-Sequenzen der *psbA*-mRNA von Vertretern der Angiospermen, darunter 13 Sequenzen aus dikotylen und vier Sequenzen aus monokotylen Pflanzen. Die mRNA-Sequenzen besitzen eine relativ einheitliche Länge von 1230 – 1250 nt. Die Faltungsenergien ΔG der mit dem Programm CSRNAFOLD berechneten thermodynamisch optimalen Sekundärstrukturen lagen im Bereich von ca. 480 – 515 kJ·mol⁻¹, die auf die Sequenzlänge normierte mittlere Energie pro Nukleotid ($\Delta G/\text{nt}$) lag bei 0,38 – 0,41 kJ·mol⁻¹. Die Berechnung der individuellen Sekundärstrukturen der mRNAs ergab, daß die einzelnen RNAs unterschiedlich stark strukturiert sind, wobei neben lokalen Haarnadelstrukturen auch Basenpaarungen über längere Distanzen der RNA-Sequenz vorkommen. Beispielhaft sind hier die thermodynamisch optimalen Strukturen der *psbA*-mRNA aus Spinat und aus *Arabidopsis* dargestellt:

Bei Spinat ist die *psbA*-mRNA sehr strukturreich (**Abb. 4.7**). Es finden sich ausgedehnte zum Teil verzweigte Haarnadelstrukturen, aber auch Helices, in denen weiter entfernte Bereiche der *psbA*-Sequenz miteinander basengepaart sind. Beispielsweise bildet im Bereich des 5'-Endes die Region von Position 44 bis 89 mit der Region von Position 839 bis 868 eine unterbrochene Helix aus, die ihrerseits stark strukturierte Bereiche der *psbA*-mRNA einschließt; auch das Translationsstartcodon liegt hier basengepaart vor. Am 3'-Ende der mRNA findet

sich eine lokale Haarnadelstruktur zwischen Position 1187 und 1243. Die Faltungsenergie ΔG der thermodynamisch optimalen berechneten mRNA-Struktur beträgt $513,6 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, bzw. $\Delta G/\text{nt} = 0,412 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Bei *Arabidopsis* (**Abb. 4.8**) ist die *psbA*-mRNA deutlich weniger reich an Sekundärstrukturen als bei Spinat; hier finden sich überwiegend lokale Strukturelemente. Die 5'-untranslatierte Region der mRNA enthält eine isolierte Haarnadelstruktur zwischen Position 2 und 34, das Translationsstartcodon ist in einem einzelsträngigen Bereich der RNA. Im Bereich des 3'-Endes finden sich zwei lokale Haarnadelstrukturen zwischen Position 1097 und 1159, sowie zwischen Position 1168 und 1234. Die kodierende Region der *psbA*-mRNA enthält mehrere teilweise stark verzweigte Haarnadelstrukturen. Die Faltungsenergie ΔG der berechneten mRNA-Struktur beträgt hier $510,8 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, bzw. $\Delta G/\text{nt} = 0,413 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$. Es zeigt sich hier, daß allein die freie Energie der thermodynamisch optimalen Faltung keine Information über die tatsächliche RNA-Sekundärstruktur liefert, zumal eine beliebige mRNA generell eine ähnliche Faltungsenergie besitzt wie eine gleich lange Zufalls-Sequenz (Wokman & Krogh, 1999). Lokale Strukturelemente spielen bei der biologischen Funktion einer mRNA eine bedeutende Rolle – gerade derartige lokale Elemente lassen sich nur identifizieren, wenn bei der Strukturberechnung – wie hier durchgeführt – die Verteilung der thermodynamisch optimalen und suboptimalen Strukturen berücksichtigt wird (Lück, 1997; Wokman & Krogh, 1999).

Die hier verwendeten 17 Vollängensequenzen der *psbA*-mRNA zeigten im Bereich der kodierenden Region eine sehr hohe Konserviertheit auf Sequenzebene (95 – 99 % in der kodierenden Region und 45 – 55 % in den 5'- und 3'-untranslatierten Regionen). Bei der interaktiven Optimierung der Consensus-Basenpaarwahrscheinlichkeitsmatrix wurde daher so vorgegangen, daß das Alignment der kodierenden Regionen unangetastet blieb. In den untranslatierten Bereichen wurden aber kleinere Verschiebungen von Sequenzen vorgenommen, um die Consensus-Struktur zu verbessern. Ferner wurden die Sequenzen bei der Summierung der Basenpaarwahrscheinlichkeiten hinsichtlich ihrer verwandtschaftlichen Nähe gewichtet. Dies sollte verhindern, daß Gruppen eng verwandter Arten die Consensus-RNA-Struktur dominieren. Als einfache Regel galt hier, daß alle Vertreter einer Gattung jeweils in der Summe den Gewichtungsfaktor 1 erhalten.

Die Aufsummierung der Basenpaarwahrscheinlichkeiten der einzelnen mRNA-Sequenzen zur Consensus-Struktur ergab folgendes Bild (**Abb. 4.9**): Im Vergleich zu den Sekundärstrukturen der Einzelsequenzen ist die Consensus-Struktur der *psbA*-mRNA deutlich weniger reich an Strukturelementen. Somit ist nur ein kleiner Teil der in einzelnen *psbA*-Sequenzen vorhersagbaren Strukturen auch zwischen verschiedenen Angiospermenarten konserviert. Die *psbA*-Consensus-Struktur enthält ausschließlich lokale Strukturelemente. Im Bereich der 3'-untranslatierten Region findet sich eine stark konservierte unterbrochende Haarnadelstruktur, ebenso enthält auch die 5'-untranslatierte Region ein solches Strukturelement, das allerdings weniger stark konserviert ist. Weitere Haarnadelstrukturen finden sich in der kodierten Regi-

A					
Familie	Art	mRNA-Länge	Gewicht	ΔG [$\frac{kJ}{mol}$]	$\Delta G/nt$ [$\frac{kJ}{mol}$]
<i>Brassicaceae</i>	<i>Arabidosis thaliana</i>	1238 nt	1,0	−510,8	−0,413
	<i>Brassica napus</i>	1247 nt	1,0	−506,1	−0,406
	<i>Sinapis alba</i>	1249 nt	1,0	−502,5	−0,402
<i>Solanaceae</i>	<i>Nicotiana debneyi</i>	1248 nt	0,25	−502,4	−0,403
	<i>Nicotiana glutinosa</i>	1249 nt	0,25	−510,3	−0,409
	<i>Nicotiana plumbaginifolia</i>	1229 nt	0,25	−490,8	−0,399
	<i>Nicotiana tabacum</i>	1249 nt	0,25	−508,0	−0,407
	<i>Solanum niger</i>	1249 nt	1,0	−515,3	−0,413
<i>Fabaceae</i>	<i>Glycine max</i>	1241 nt	1,0	−489,9	−0,395
	<i>Pisum sativum</i>	1251 nt	1,0	−490,3	−0,392
	<i>Vicia faba</i>	1250 nt	1,0	−488,4	−0,391
<i>Malvaceae</i>	<i>Gossypium hirsutum</i>	1233 nt	1,0	−498,1	−0,404
<i>Chenopodiaceae</i>	<i>Spinacia oleracea</i>	1247 nt	1,0	−513,6	−0,412
<i>Poaceae</i>	<i>Hordeum vulgare</i>	1241 nt	1,0	−484,7	−0,391
	<i>Oryza sativa</i>	1243 nt	1,0	−481,8	−0,388
	<i>Secale cereale</i>	1354 nt	1,0	−511,3	−0,378
	<i>Zea mays</i>	1237 nt	1,0	−498,9	−0,403
B					
Sequenzhomologie:		5'-UTR	ORF	3'-UTR	
		ca. 55 %	ca. 98 %	ca. 45 %	

Tabelle 4.2: **A:** Pflanzenarten, deren ***psbA*-mRNA-Sequenzen** für die CONSTRUCT-Rechnungen Verwendung fanden. — mRNA-Länge: Länge der für die Sekundärstruktur-Rechnungen verwendeten mRNA-Sequenz. — Gewicht: Dieser Wert gibt den Gewichtungsfaktor für die Erstellung der Consensus-Struktur an. Jede *Gattung* erhält den Wert 1. — ΔG : Faltungsenergie der thermodynamisch optimalen Sekundärstruktur (Programm CSRNAFOLD, 25 °C). — $\Delta G/nt$: Durchschnittliche Faltungsenergie, bezogen auf die Länge der mRNA-Sequenz. — **B:** Homologien der 5'-untranslatierten Regionen (5'-UTR), der kodierenden Regionen (open reading frames / ORF) und 3'-untranslatierten Regionen (3'-UTR) der *psbA*-Sequenzen (Programm GENEDOC).

on der mRNA. In der hier gewählten Strukturdarstellung, bei der nur Basenpaare mit einer Wahrscheinlichkeit von mehr als 50 % gezeigt werden, können insgesamt 15 Haarnadelstrukturen unterschieden werden, die hier in 5'→3'-Richtung mit I bis XV bezeichnet werden.

4.2.4 Konservierte Strukturelemente der *rbcL*-mRNA

Aus der GENBANK-Sequenzdatenbank konnten von insgesamt 23 Angiospermenarten Voll-Längensequenzen der *rbcL*-mRNA entnommen werden (Tabelle 4.3). Dikotyle Pflanzen waren mit 10 Familien und 15 Arten vertreten, die acht monokotylen Pflanzen gehörten ohne Ausnahme zur Familie *Poaceae*. Die einzelnen Sequenzen besaßen eine Länge von 1650 bis 1750 Nukleotiden. Eine Ausnahme in diesem Satz homologer mRNA-Sequenzen bildete die *rbcL*-Sequenz aus Gerste, bei der die 3'-untranslatierte Region in der Datenbank fehlte. Die Sequenz wurde aber dennoch in die Analyse konservierter Strukturen mit einbezogen, da Gerste zu den vier Angiospermenarten gehört, für die experimentelle Daten zur *in vivo*-Stabilität der *rbcL*-mRNA vorliegen (Kim *et al.*, 1993). Ähnlich wie bei der *psbA*-mRNA zeigen auch die einzelnen *rbcL*-mRNA-Sequenzen Unterschiede in Lage und Umfang von Sekundärstrukturen. Stellvertretende werden hier die mRNAs aus Spinat und *Arabidopsis* näher vorgestellt:

Die *rbcL*-mRNA aus Spinat (**Abb. 4.10**) ist deutlich weniger stark strukturiert als die *psbA*-mRNA. Allerdings finden sich auch hier Helices, die zwischen weiter entfernt gelegenen Abschnitten der mRNA-Sequenz ausgebildet werden und größere ungefaltete Bereiche der mRNA-Sequenz einschließen. Darüber hinaus finden sich isoliert angeordnete Haarnadelstrukturen in der kodierenden Region. Das 5'-Ende und das 3'-Ende der mRNA werden jeweils durch eine Haarnadelstruktur abgeschlossen, das Translationsstartcodon liegt einzelsträngig vor. Die Freie Energie der thermodynamisch optimalen Struktur beträgt $\Delta G = 682,0 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, bzw. $\Delta G/\text{nt} = 0,405 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$.

In *Arabidopsis* (**Abb. 4.11**) enthält die *rbcL*-mRNA deutlich weniger Struktur als in Spinat. In der 5'- und 3'-untranslatierten Region findet sich jeweils eine Haarnadelstruktur. Weitere isolierte Strukturelemente sind verteilt über die kodierende Region angeordnet, auch hier ist die Region der Translationsinitiation einzelsträngig. Die Freie Energie der thermodynamisch optimalen Struktur beträgt hier $\Delta G = 684,7 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, bzw. $\Delta G/\text{nt} = 0,401 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Die *rbcL*-mRNA ist – ähnlich wie die *psbA*-mRNA bei Angiospermen auf der Sequenzebene sehr stark konserviert. Sequenzhomologie beträgt in der kodierenden Region ca 90 – 95 % und in den untranslatierten Bereichen 43 – 58 %. Bei der interaktiven Optimierung des Sequenzalignments zugunsten einer verbesserten Consensus-Sekundärstruktur wurden wie im Fall der *psbA*-mRNA Verschiebungen einzelner Sequenzbereiche im Alignment ausschließlich innerhalb der untranslatierten Regionen vorgenommen. Auch bei der Berechnung der *rbcL*-Consensus-Struktur wurden die einzelnen Sequenzen auf der systematischen Ebene der

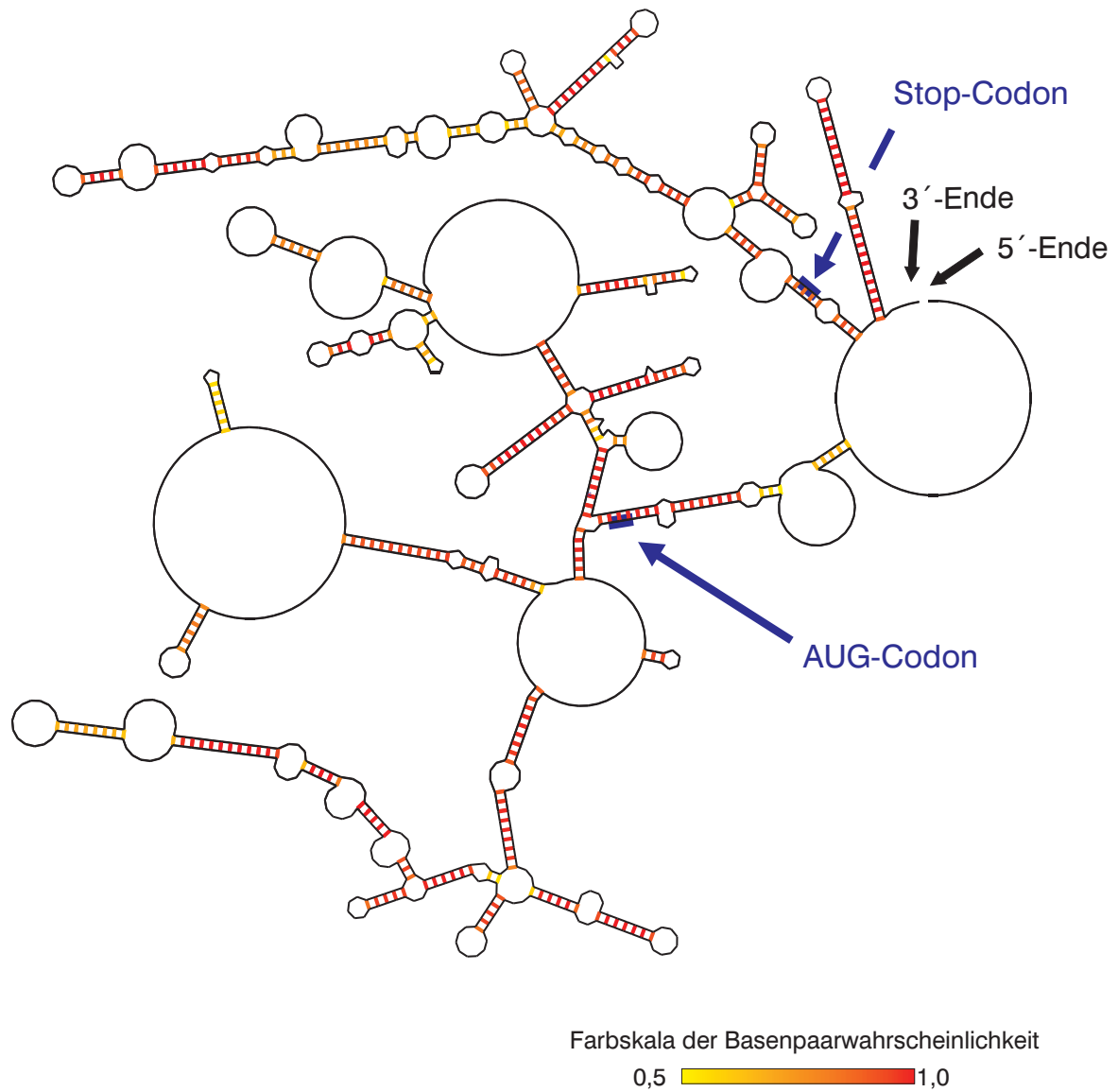


Abbildung 4.7: **Spinat: Sekundärstruktur der *psbA*-mRNA.** Die Struktur wurde mit dem Programm CSRNAFOLD/CONSTRUCT bei 50 °C berechnet. Die Basenpaarungswahrscheinlichkeiten als Maß für die Stabilität einzelner Helices/Strukturelemente ist durch gelb-rote Farbkodierung angegeben.

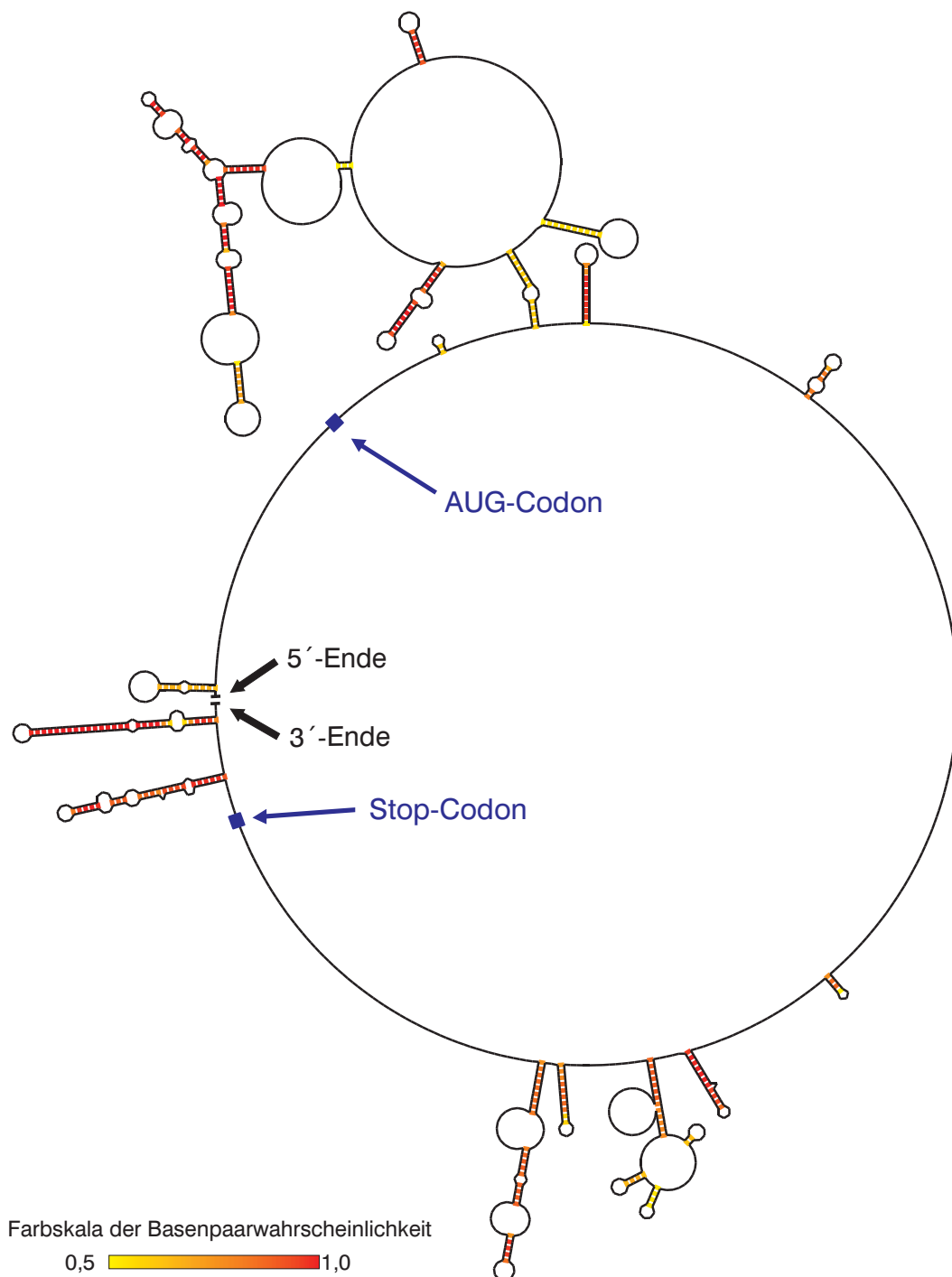


Abbildung 4.8: *Arabidopsis*: Sekundärstruktur der *psbA*-mRNA. Die Struktur wurde mit dem Programm CSRNAFOLD/CONSTRUCT bei 50 °C berechnet. Die Basenpaarungswahrscheinlichkeiten als Maß für die Stabilität einzelner Helices/Strukturelemente ist durch gelb-rote Farbkodierung angegeben.

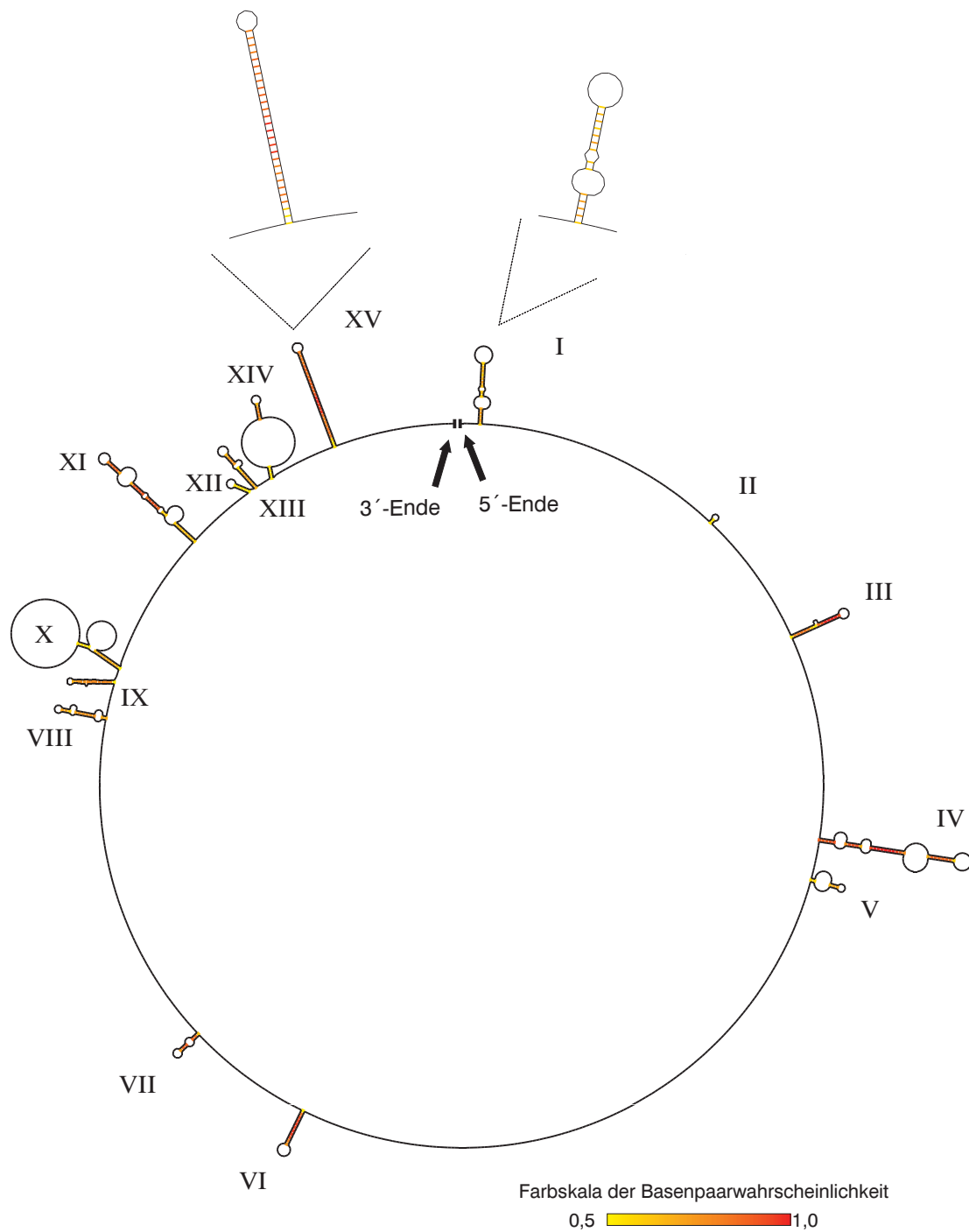


Abbildung 4.9: *psbA*-mRNA, **Consensus-Struktur**. Dargestellt sind alle Basenpaare mit einer Wahrscheinlichkeit von mindestens 0,5. Die einzelnen lokalen Haarnadelstrukturen sind von I bis XV in 5'→3'-Richtung nummeriert.

Gattung gleich gewichtet, d. h. alle Vertreter einer Gattung erhielten in der Summe den Gewichtungsfaktor 1 (vgl. Tabelle 4.3).

Die Bestimmung der Consensus-Struktur aller 23 *rbcL*-mRNA-Sequenzen ergab, daß nur ein kleiner Teil der in den einzelnen Sequenzen vorkommenden Sekundärstruktur motive innerhalb der Blütenpflanzen konserviert ist. Darüberhinaus fällt auf, daß die *rbcL*-mRNA weitaus weniger konservierte Strukturen enthält als die *psbA*-mRNA. Allerdings enthält die *rbcL*-mRNA in der Consensusstruktur wie die *psbA*-mRNA je eine Haarnadelstruktur in der 3'- und 5'-untranslatierten Region, wobei die Struktur in der 3'-untranslatierten Region stärker konserviert ist. Bei einer Darstellung der *rbcL*-Consensus-Struktur mit allem Basenpaaren einer Wahrscheinlichkeit von mehr als 50 % lassen sich insgesamt 16 Haarnadelstrukturen unterscheiden, von denen allerdings die meisten nur wenige Basenpaare enthalten (siehe **Abb. 4.12**).

Tabelle 4.3 (folgende Seite) – Pflanzenarten, deren ***rbcL*-mRNA-Sequenzen** für die CONSTRUCT-Rechnungen Verwendung fanden. — mRNA-Länge: Länge der für die Sekundärstruktur-Rechnungen verwendeten mRNA-Sequenz. — Gewicht: Dieser Wert gibt den Gewichtungsfaktor für die Erstellung der Consensus-Struktur an. Jede *Gattung* erhält den Wert 1. — ΔG : Faltungsenergie der thermodynamisch optimalen Sekundärstruktur (Programm CSRNAFOLD, 25 °C). — $\Delta G/nt$: Durchschnittliche Faltungsenergie, bezogen auf die Länge der mRNA-Sequenz.. — **B**: Homologien der 5'-untranslatierten Regionen (5'-UTR), der kodierenden Regionen (open reading frames / ORF) und 3'-untranslatierten Regionen (3'-UTR) der *rbcL*-Sequenzen (Programm GENEDOC). — ¹Der verfügbaren mRNA-Sequenz fehlt die 3'-untranslatierte Region. Da für Gerste *in vivo*-Daten zu mRNA-Stabilitäten in Chloroplasten vorliegen (Kim *et al.*, 1993), wurde die Sequenz dennoch in die Analyse einbezogen.

A

Familie	Art	mRNA-Länge	Gewicht	$\Delta G \left[\frac{kJ}{mol} \right]$	$\Delta G/nt \left[\frac{kJ}{mol} \right]$
<i>Basellaceae</i>	<i>Basella alba</i>	1723 nt	1,0	−693,2	−0,402
<i>Brassicaceae</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1708 nt	1,0	−684,7	−0,401
<i>Solanaceae</i>	<i>Nicotiana acuminata</i>	1755 nt	0,33	−726,6	−0,414
	<i>Nicotiana otophora</i>	1755 nt	0,33	−721,4	−0,411
	<i>Nicotiana tabacum</i>	1752 nt	0,33	−728,1	−0,415
	<i>Petunia hybrida</i>	1731 nt	1,0	−709,7	−0,410
<i>Malvaceae</i>	<i>Gossypium hirsutum</i>	1664 nt	1,0	−678,4	−0,408
<i>Chenopodiaceae</i>	<i>Spinacia oleracea</i>	1684 nt	1,0	−682,0	−0,405
	<i>Atriplex rosea</i>	1691 nt	1,0	−671,7	−0,397
<i>Asteraceae</i>	<i>Flaveria pringlei</i>	1705 nt	1,0	−698,4	−0,410
<i>Convolvulaceae</i>	<i>Cuscuta reflexa</i>	1788 nt	1,0	−701,7	−0,392
	<i>Ipomoea purpurea</i>	1764 nt	1,0	−726,1	−0,411
<i>Phytolaccaceae</i>	<i>Gisekia pharnacioides</i>	1712 nt	1,0	−686,1	−0,401
<i>Orobanchaceae</i>	<i>Orobranche corymbosa</i>	1699 nt	1,0	−679,0	−0,400
<i>Salicaceae</i>	<i>Populus deltoides</i>	1691 nt	1,0	−692,6	−0,410
<i>Poaceae</i>	<i>Hordeum vulgare</i> ¹	1478 nt	1,0	−583,5	−0,395
	<i>Avena sativa</i>	1623 nt	1,0	−644,8	−0,397
	<i>Neurachne munroi</i>	1757 nt	0,5	−694,6	−0,395
	<i>Neurachne tenuifolia</i>	1755 nt	0,5	−696,6	−0,397
	<i>Oryza sativa</i>	1784 nt	1,0	−707,4	−0,397
	<i>Triticum aestivum</i>	1673 nt	1,0	−645,9	−0,386
	<i>Setaria italica</i>	1715 nt	1,0	−699,0	−0,408
	<i>Zea mays</i>	1744 nt	1,0	−693,7	−0,398

B

Sequenzhomologie:	5'-UTR	ORF	3'-UTR
	ca. 58 %	98 %	ca. 43 %

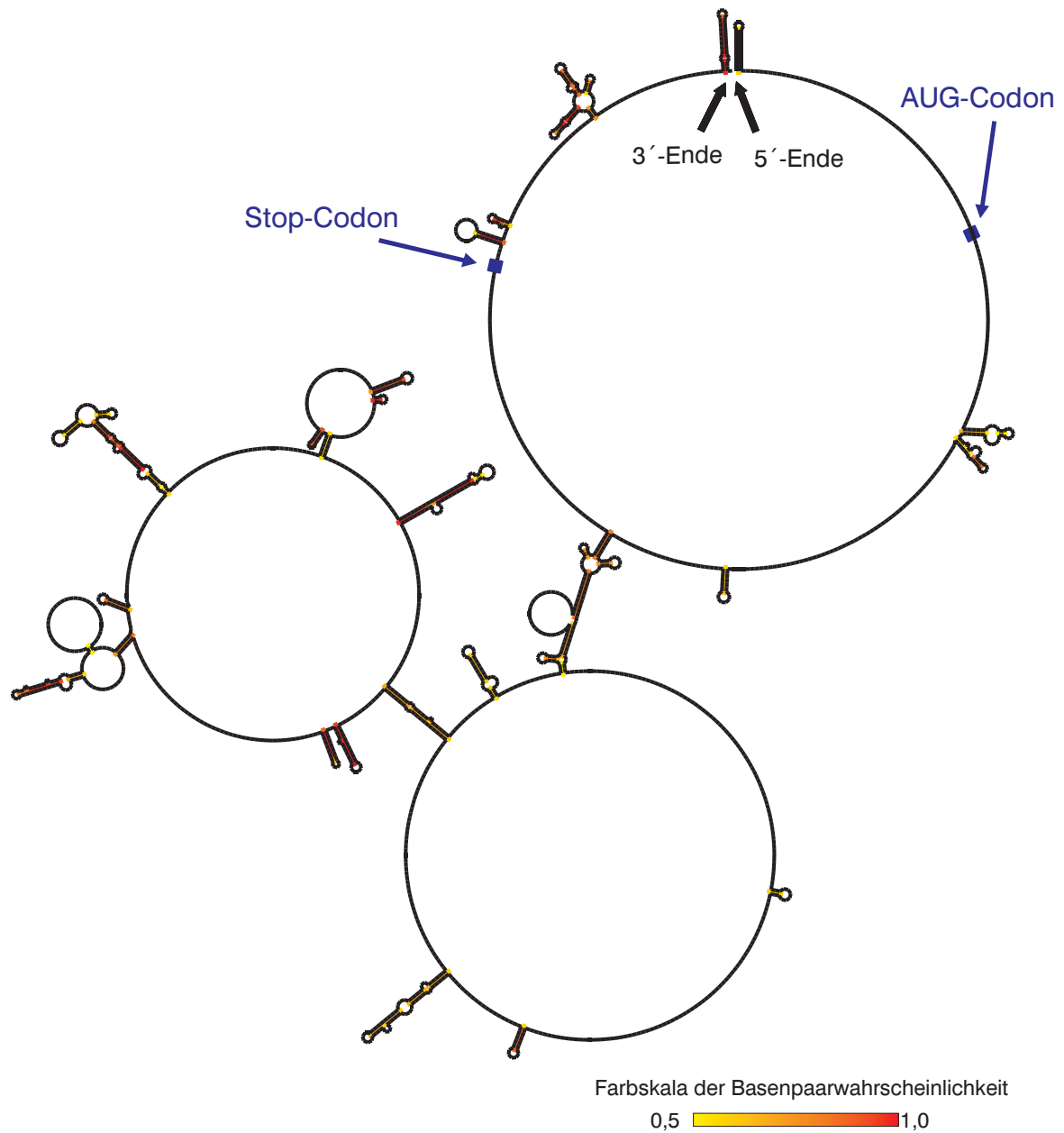


Abbildung 4.10: **Spinat: Sekundärstruktur der *rbcL*-mRNA.** Die Struktur wurde mit dem Programm CSRNAFOLD/CONSTRUCT bei 50 °C berechnet. Die Basenpaarungswahrscheinlichkeiten als Maß für die Stabilität einzelner Helices/Strukturelemente ist durch gelb-rote Farbkodierung angegeben.

4.2.5 Zusammenfassung der Strukturberechnungen

Die Vorhersage der konservierten Sekundärstrukturen der *psbA*- und *rbcL*-mRNAs der Angiospermen ergab:

- Sowohl die *psbA*- als auch die *rbcL*-mRNA weisen konservierte Strukturelemente im Bereich der untranslatierten Regionen wie auch in der kodierenden Region auf. Dabei handelt es sich ausnahmslos um kleinere lokale Haarnadelstrukturen. Diese Haarnadelstrukturen sind bei der *psbA*-mRNA größer (sie enthalten mehr Basenpaare) und auch generell stärker konserviert als bei der *rbcL*-mRNA.
- Die in der Literatur beschriebene Haarnadelstruktur innerhalb der 3′-untranslatierten Region plastidärer mRNAs (Stern & Gruissem, 1989; Drager *et al.*, 1999) ist in der *psbA*- und *rbcL*-mRNA ein stark konserviertes Strukturelement. Dies stimmt mit der postulierten Bedeutung dieser Struktur als Prozesierungssignal sowie als Barriere für 3′→5′-Exonukleasen überein.
- In beiden untersuchten mRNAs konnte eine konservierte Haarnadelstruktur innerhalb der 5′-untranslatierten Region identifiziert werden, die allerdings deutlich weniger stark konserviert ist als die Struktur der 3′-untranslatierten Region.

In Kap. 7 (Dokumentationen) finden sich Darstellungen der Consensus-Basenpaarwahrscheinlichkeitsmatrizen der *psbA*- und *rbcL*-mRNA (untranslatierte Regionen), sowie Darstellungen der *psbA*- und *rbcL*-Sequenzalignments inklusive der konservierten Strukturelemente.

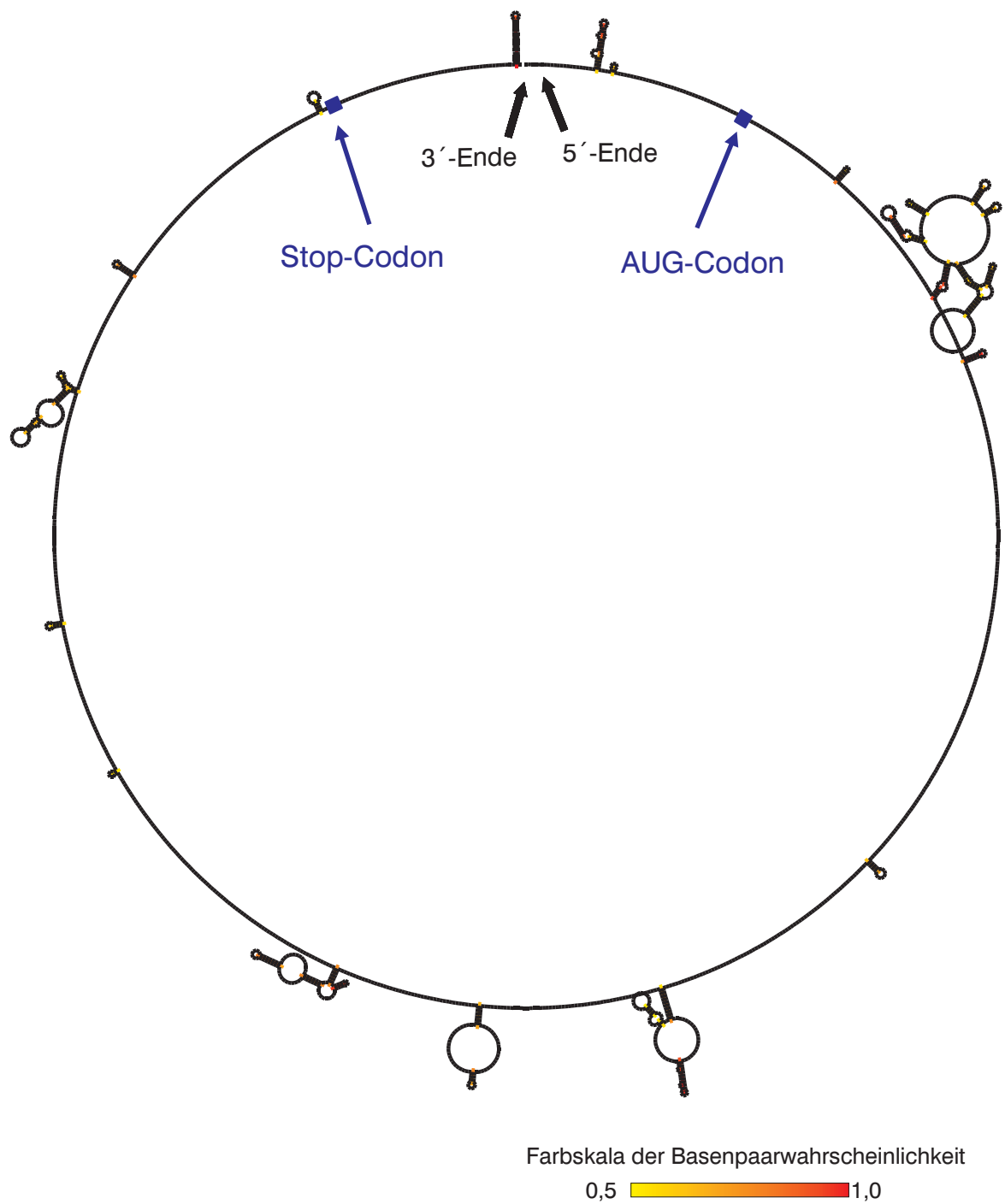


Abbildung 4.11: *Arabidopsis*: Sekundärstruktur der *rbcL*-mRNA. Die Struktur wurde mit dem Programm csRNAfold/CONSTRUCT bei 50 °C berechnet. Die Basenpaarungswahrscheinlichkeiten als Maß für die Stabilität einzelner Helices/Strukturelemente ist durch gelb-rote Farbkodierung angegeben.

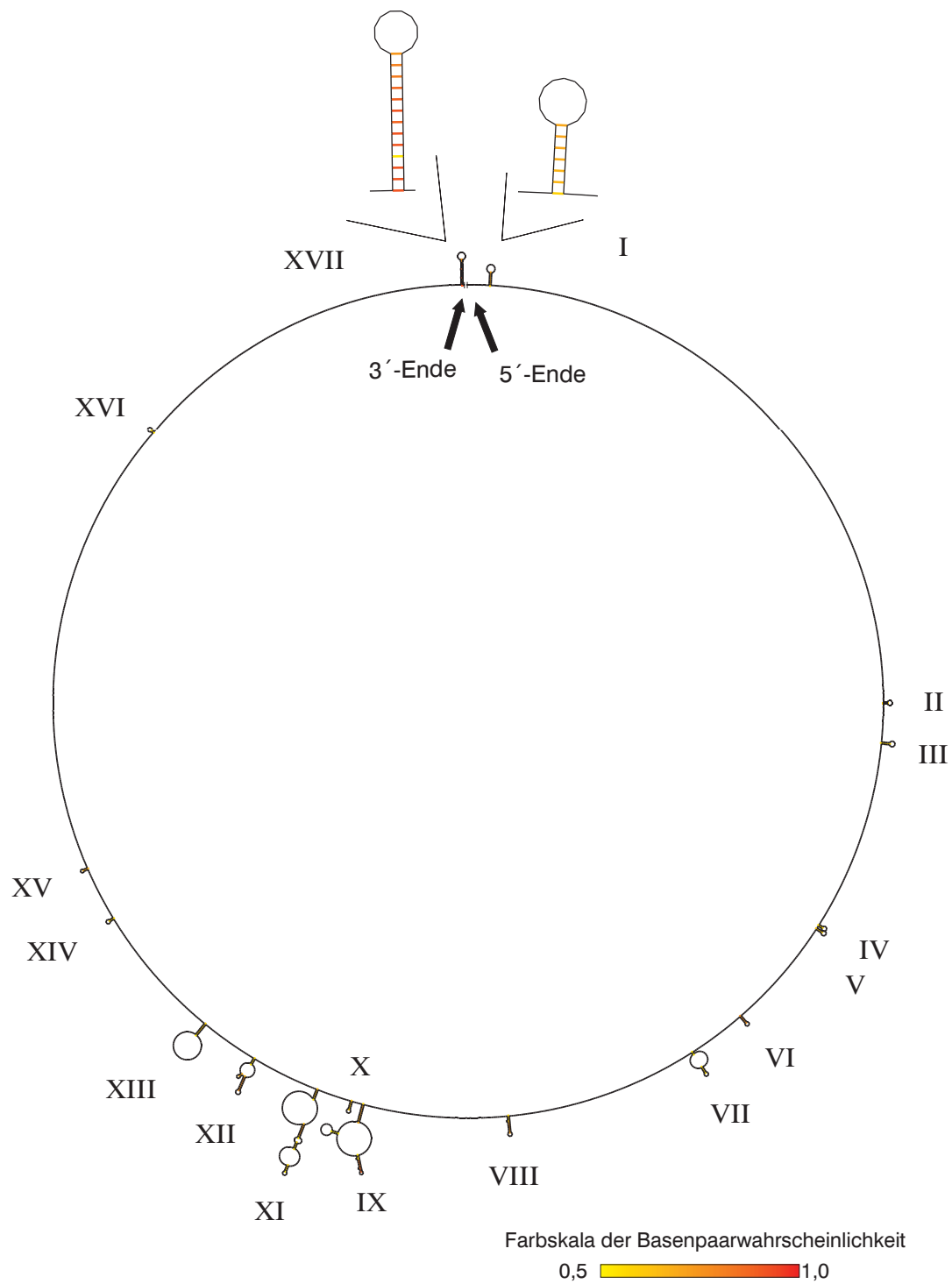


Abbildung 4.12: *rbcL*-mRNA, Consensus-Struktur. Dargestellt sind alle Basenpaare mit einer Wahrscheinlichkeit von mindestens 0,5. Die einzelnen lokalen Haarnadelstrukturen sind von I bis XV in 5'→3'-Richtung numeriert.

4.3 Mechanismus des Abbaus der *psbA*-mRNA

Es konnte bereits in früheren Arbeiten gezeigt werden, daß der Abbau der *psbA*-mRNA in Spinatchloroplasten durch endonukleolytische Schnitte eingeleitet wird, die das RNA-Molekül vom 5'-Ende her in definierte Fragmente zerlegen (Klaff, 1995). Diese endonukleolytischen Schnitte erfolgen an exakt definierten Positionen des mRNA-Moleküls; die identifizierten Schnittstellen liegen mit einer Ausnahme (Position -48) innerhalb der kodierenden Region. Im folgenden werden die Analyse von Richtung und Reihenfolge der Spaltungsereignisse sowie die relative Bedeutung einzelner Schnittstellen innerhalb der *psbA*-mRNA beschrieben. Methodisch wurde dazu die hochauflösende Northernanalyse eingesetzt. Außerdem wurde anhand des Abbaus von teilweise doppelsträngigen *in vitro*-Transkripten der *psbA*-mRNA (Vollänge) in lysierten Chloroplasten der Einfluß der mRNA-Struktur auf den Abbauprozess untersucht.

4.3.1 Prinzip der Analyse von mRNA-Abbau mittels hochauflösendem Nachweis von Degradationsfragmenten

Die hochauflösende Northernanalyse des RNA-Abbaus nutzt die höhere Trennschärfe eines Polyacrylamidgels im Vergleich zu einem Agarosegel aus, die im Fall der *psbA*-mRNA die Identifizierung distinkter Degradationsprodukte ermöglicht. Dabei wird in Kauf genommen, daß der Transfer der RNA aus dem Polycrylamidgel auf die Nylon-Membran bei längeren RNA-Molekülen nicht vollständig erfolgt. Genaue quantitative Aussagen über relative oder absolute Mengen bestimmter RNA-Spezies sind nicht möglich, dennoch lassen sich qualitative Mengenabschätzungen durchführen. Verwendet man bei der Analyse von RNA-Abbaukinetiken zum Nachweis einer bestimmten RNA Oligonukleotide als Sonden, so lassen sich über die Position, an der das Oligonukleotid die Ziel-RNA bindet, und die Länge der nachgewiesenen Fragmente Aussagen über die Position von Schnittstellen gewinnen. Bei den hier durchgeführten Untersuchungen konnten allerdings keine auf das Nukleotid genauen Längenbestimmungen von RNA-Degradationsfragmenten durchgeführt werden, daher wurde auch auf die bereits bekannten Positionen von generell identifizierten Schnittstellen zurückgegriffen.

Die **Abb. 4.13** zeigt das Prinzip der hier durchgeführten hochauflösenden Northernanalyse: Im einfachsten Fall werden zur Bestimmung der Richtung, in der der endonukleolytische Abbau des RNA-Moleküls erfolgt, zwei Oligonukleotid-Sonden verwendet. Die erste erkennt das 5'-Ende der RNA, die zweite das 3'-Ende. Laufen die endonukleolytischen Schnitte in 5'→3'-Richtung über das RNA-Molekül, so ist zu erwarten, daß die 5'-spezifische Sonde nur die Vollänge der RNA und im günstigen Fall auch das durch den ersten Schnitt erzeugte Zerfallsprodukt erkennt. Die 3'-spezifische Sonde sollte hingegen eine Leiter zahlreicher Fragmente erkennen, die allesamt ein intaktes 3'-Ende besitzen. In Fall eines mRNA-Abbaus in 3'→5'-Richtung sind die Verhältnisse entsprechend umgekehrt: Hier sollten zahlreiche

Abbaumechanismus einer mRNA: hochauflösende Northernanalyse

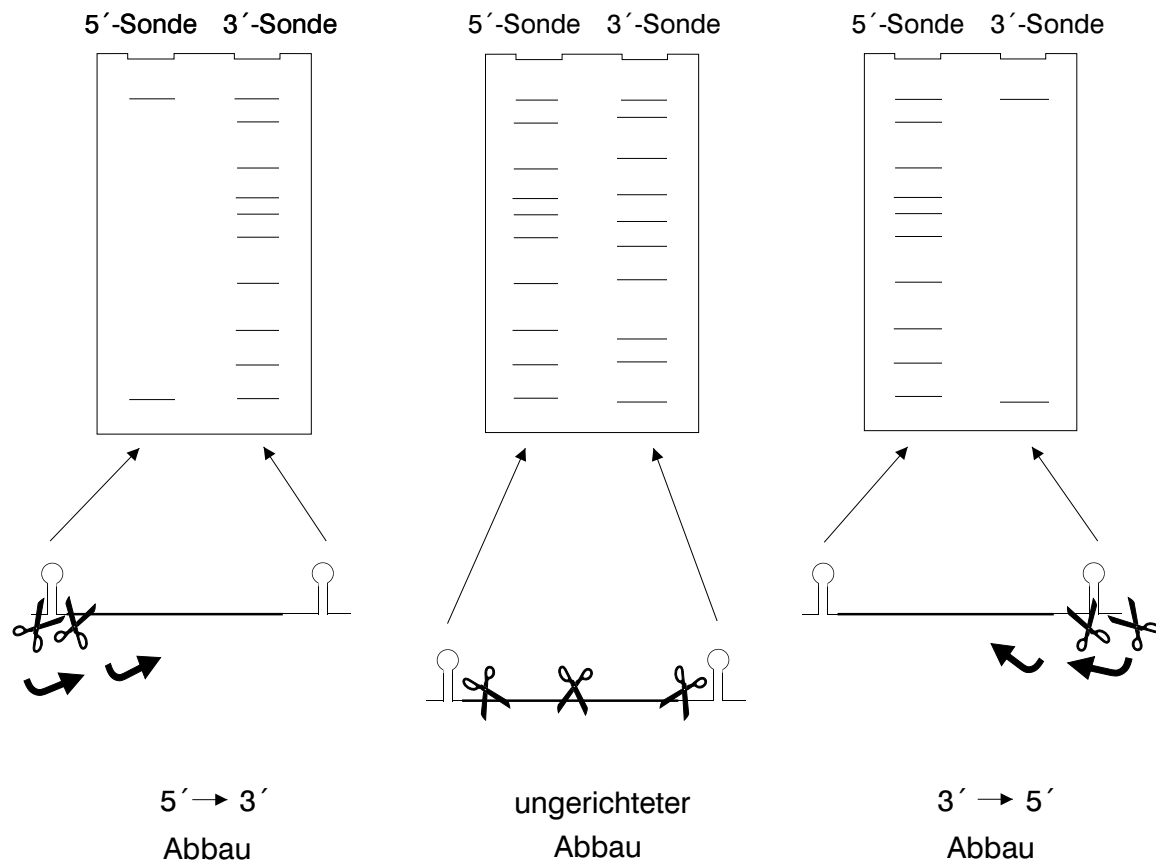


Abbildung 4.13: **Identifizierung der Abbaurichtung einer RNA.** — Die während eines Zerfallsexperimentes präparierte RNA wird in einer hochauflösenden Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt; nach Transfer auf eine Membran werden die Degradationsfragmente mit Oligonukleotiden, die jeweils spezifische das 5'- und 3'-Ende der RNA erkennen, nachgewiesen. LINKS: Erfolgen endonukleolytische Schnitte in 5'→3'-Richtung, so erkennt die 5'-spezifische Sonde nur die RNA-Volllänge sowie ein am 5'-Ende abgespaltenes Fragment, während eine 3'-End-spezifische Sonde einer Leiter vieler Fragmente nachweist. MITTE: Beide Oligonukleotidsonden erkennen bei ungerichteten endonukleolytischen Schnitten eine Leiter von Degradationsintermediaten. RECHTS: Nachweismuster der Sonden bei Abbau in 3'→5'-Richtung.

Fragmente mit intaktem 5'-Ende nachweisbar sein. Erfolgt der endonukleolytische Abbau in ungerichteter Weise, so sollten sich zahlreiche Fragmente mit jeweils intaktem 5'- oder 3'-Ende detektieren lassen.

Für die Analyse des Abbaus der *psbA*-mRNA wurde auf der Grundlage der bereits gezeigten Tatsache, daß endonukleolytische Schnitte in 5'→3'-Richtung erfolgen, ein präziserer Ansatz verfolgt. Insbesondere sollte geklärt werden, ob die einzige Schnittstelle, die sich in der 5'-untranslatierten Region der mRNA befindet, eine besondere Rolle bei der Initiation des Abbaus der mRNA spielt. **Abb. 4.14** zeigt die für die Northern-Analysen verwendeten

Sonden:

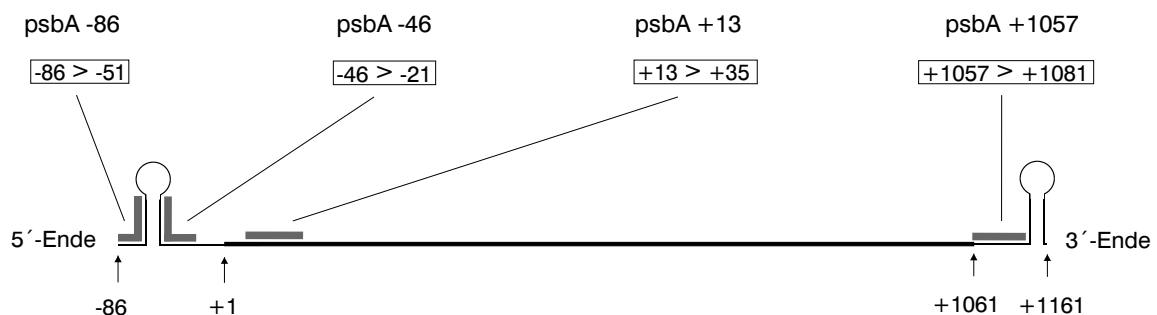


Abbildung 4.14: Bindestellen der Oligonukleotidsonden auf der *psbA*-mRNA zum Nachweis der mRNA-Abbaurichtung. Die kodierende Region ist durch eine dickere Linie hervorgehoben, ferner sind die postulierten Haarnadelstrukturen in der 5'- und 3'-untranslatierten Region dargestellt. Die Oligonukleotidsonde „psbA +13“ wurde nur bei den Untersuchungen zum Mechanismus der magnesiuminduzierten RNA-Stabilisierung verwendet (siehe Kap. 4.5).

Oligonukleotid-Sonden und ihre Bindestellen auf der *psbA*-mRNA. Die Sonde „psbA -86“ bindet 5'-terminal, die Sonde „psbA -46“ bindet innerhalb der 5'-untranslatierten Region stromabwärts der bei Position -48 liegenden Schnittstelle. Die Sonde „psbA +13“ bindet am Anfang der kodierenden Region, das Oligonukleotid „psbA +1057“ innerhalb der 3'-untranslatierten Region.

4.3.2 Intakte und lysierte Chloroplasten: Abbau der endogenen *psbA*-mRNA

Die **Abb. 4.15** zeigt das Ergebnis eines RNA-Zerfallsexperimentes über 120 Minuten in lysierten bzw. über 9 Stunden in intakten Chloroplasten, die in Gegenwart von 10 mM MgCl₂ präpariert wurden. Die Inkubation fand bei Raumtemperatur (23 °C) statt. Die intakten Chloroplasten wurden zuvor auf ca. 10⁸ – 10⁹ Organellen pro ml eingestellt, die Konzentration

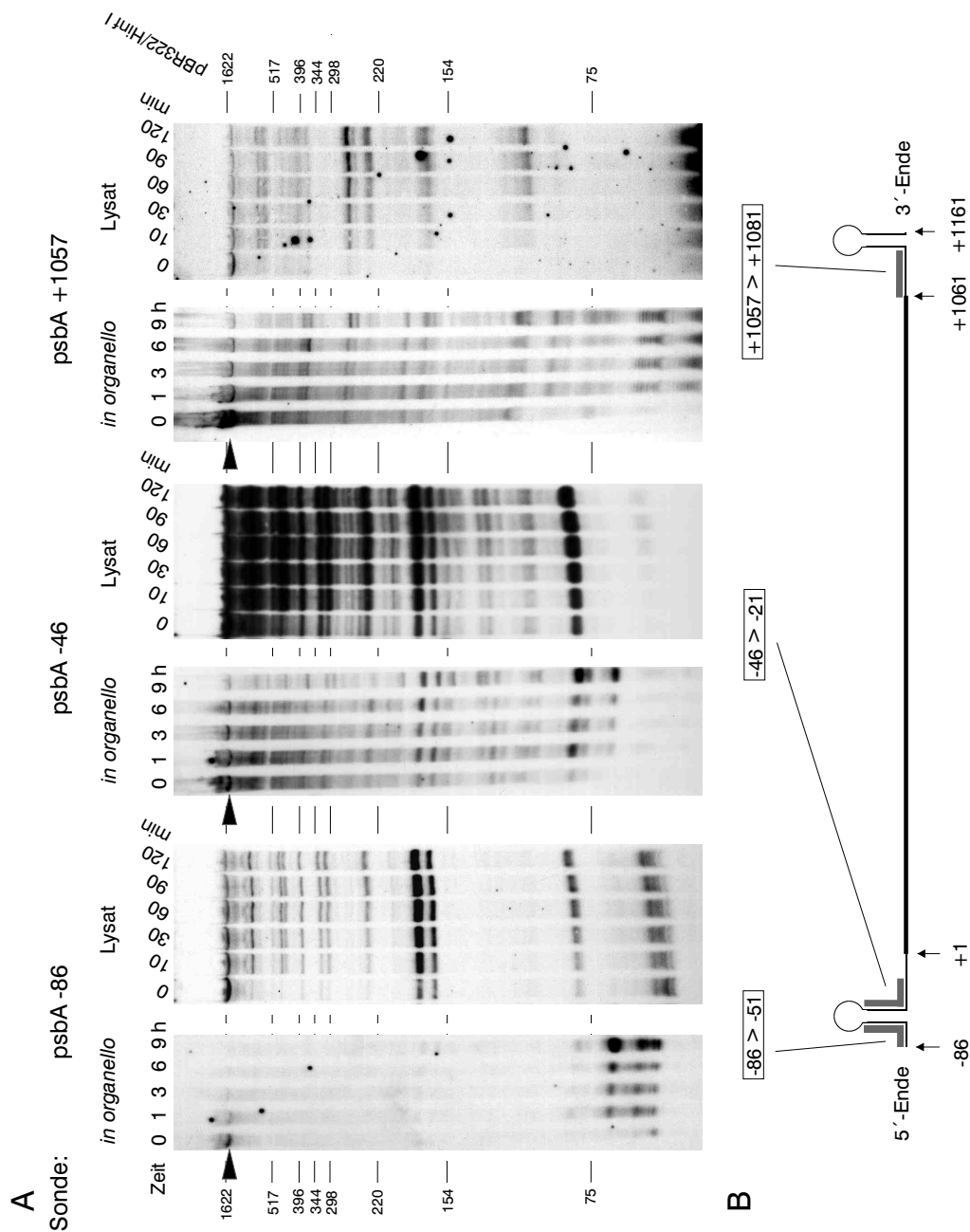


Abbildung 4.15: Abbau der *psbA*-mRNA *in organello* und in lysierten Chloroplasten (Lysat).— **A:** Hochauflösende Northernanalyse des RNA-Abbaus gemäß der Beschreibung in Kap. 3.3.2/3.3.3. Intakte und lysierte Chloroplasten wurden in Extrakt-puffer in Gegenwart von 10 mM MgCl_2 inkubiert. Nach den angegebenen Zeitpunkten wurde plastidäre Gesamt-RNA präpariert und auf einem 5 %igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Als Molekulargewichtsstandard diente der DNA-Marker pBR322/HinfI. — **B:** Schematische Übersicht über die Positionen, an denen die verwendeten Oligonukleotidsonden an die *psbA*-mRNA binden. Die kodierende Region der mRNA ist durch eine dickere Linie hervorgehoben, ebenso sind die postulierten Sekundärstrukturen innerhalb der 5'- und 3'- untranslatierten Regionen dargestellt. Die Positionsangaben beziehen sich auf den Translationsstartpunkt (Zurawski *et al.*, 1982).

der lysierten Chloroplasten betrug 5 mg/ml Protein. Nach den in der Abbildung angegebenen Zeitpunkten wurde aus dem Extrakt RNA präpariert und für die Northern-Analyse 5 µg Chloroplasten-RNA pro Spur eingesetzt.

Bei der Analyse der RNA-Degradation in **intakten Chloroplasten** können durch die 5'-terminal bindenden Sonde (psbA -86) neben der mit der Zeit abnehmenden Volllänge der *psbA*-mRNA nur einige kleinere Fragmente mit Längen von weniger als 70 nt nachgewiesen werden. Diese Degradationsfragmente sind zu Beginn des Zerfallsexperimentes nicht detektierbar und akkumulieren während der Dauer der Inkubation im Verlauf von 9 Stunden. Die weiter stromabwärts innerhalb der 5'-untranslatierten Region bindende Sonde „psbA -46“ markiert eine Leiter zahlreicher Fragmente, die sich nahezu über die gesamte Länge der Gelspur verteilen. Dabei nimmt die Konzentration von Degradationsintermediaten mit einer Länge von ca. 300 nt Nukleotiden und mehr während der Dauer der Zerfallsreihe ab; kleinere Fragmente akkumulieren jedoch während dieser Zeit. Die kleinsten Degradationsintermediate, die mit der 5'-terminalen Sonde nachgewiesen werden, sind durch die Sonde „psbA -46“ nicht detektierbar. Neben der vollen Länge der *psbA*-mRNA wird nur ein ca. 70 nt großes Fragment von beiden innerhalb der 5'-untranslatierten Region bindenden Sonden markiert. Die Sonde „psbA +1057“, die innerhalb der 3'-untranslatierten Region bindet, weist ebenso wie die Sonde „psbA -46“ neben der Vollängen-mRNA eine Leiter zahlreicher Fragmente nach, die sich unterhalb der Vollängen-Bande über die gesamte Gelspur verteilen. Das Muster der nachgewiesenen Degradationsintermediate unterscheidet sich erwartungsgemäß von dem der nahe des 5'-Endes der *psbA*-mRNA bindenden Sonden.

Im Fall der **lysierten Chloroplasten** zeigen die Signale Sonde „psbA -86“ neben der mit der Zeit abnehmenden vollen Länge der *psbA*-mRNA drei weitere Spezies, bei denen es sich um Degradationsintermediate der *psbA*-mRNA handelt: Zwei mRNA Fragmente von ca. 170 nt Länge, deren Signal auch bereits beim Start der RNA-Zerfallsreihe nachweisbar sind und ein Fragment von ca. 80 nt Länge, das während der Dauer des Zerfallsexperimentes stark akkumuliert. Weitere Signale kleinerer Degradationsfragmente laufen im Gel im Bereich einer Salzfront und werden daher nicht weiter aufgetrennt. Die Sonde „psbA -46“ markiert deutlich mehr Degradationsintermediate, insbesondere im Bereich höherer Molekulargewichte. Kleinere Fragmente, die am unteren Rand des Gels im Bereich der Salzfront laufen, werden durch diese Sonde nicht nachgewiesen. Die Sonde „psbA +13“ markiert zahlreiche über die Zeit akkumulierende Fragmente der *psbA*-mRNA, allerdings nur oberhalb einer Länge von ca. 140 nt. Die in der 3'-untranslatierten Region bindende Sonde (psbA +1057) weist - neben der Vollängen-mRNA - ebenfalls zahlreiche Degradationsintermediate nach. Insgesamt zeigt sich also, daß mit der 5'-terminalen Sonde nur sehr wenige distinkte Degradationsintermediate nachgewiesen werden können, während die übrigen Sonden jeweils zahlreiche Intermediate markieren.

Aus früheren Arbeiten geht hervor, daß zwischen den Bindestellen der beiden Oligonukleo-

tidsonden, die innerhalb der 5'-untranslatierten Region binden, nur eine einzige Schnittstelle liegt (Position -48). Offenbar führt ein Schnitt an dieser Position dazu, daß der distale Teil der *psbA*-mRNA, der die gesamte kodierende Region enthält, für endonukleolytischen Abbau zugänglich wird. Die Längenbestimmung der mit der 5'-terminalen Sonde nachgewiesenen Fragmente läßt eine grobe Kartierung der korrespondierenden Schnittstellen zu. Neben einem den mRNA-Abbau initiiierenden Schnitt an Position -48 führt sehr früher Schnitt im Bereich der Nukleotide +80 bis +90 zur Entstehung der beiden prominenten Fragmente der Länge von 160/170 nt. Ein weiterer früher Schnitt im Bereich des Translationsstartcodons erzeugt das 80 nt-Fragment. Es ist jedoch zu beachten, daß von einer hohen Abundanz bzw. starken Akkumulation eines Degradationsintermediates nicht zwingend auf eine hohe Spaltungsrate an bestimmten Positionen der mRNA geschlossen werden kann. Die Akkumulation von Degradationsintermediaten hängt auch von deren inhärenter Stabilität ab. Die hochauflösende Northernanalyse des mRNA-Abbaus im Chloroplastenlysat zeigt dennoch klar, daß der 5'-untranslatierten Region der *psbA*-mRNA eine zentrale Rolle bei der Initiation des mRNA-Abbaus zukommt: Eine Spaltung der mRNA innerhalb dieser Region führt zu einer starken Erhöhung der Sensitivität der kodierenden Region gegenüber weiteren endonukleolytischen Angriffen und entscheidet daher über die Stabilität der *psbA*-mRNA.

Abbau exogener *psbA* *in vitro*-Transkripte

Es gibt Hinweise aus früheren Arbeiten (Klauff, 1995), daß die endonukleolytischen Schnittstellen der *psbA*-mRNA, die die Initiation des RNA-Abbaus vermitteln, einzelsträngig vorliegen. Darüberhinaus zeigen die identifizierten Schnittstellen auch keine Konserviertheit auf Sequenzebene. Daraus läßt sich ableiten, daß die Struktur oder die strukturelle Umgebung der Schnittstellen die Zugänglichkeit für eine Endonuklease bestimmen bzw. regulieren könnte. Daher wurden RNA-Zerfallsexperimente in lysierten Chloroplasten durchgeführt, in denen der Abbau exogener *psbA*-Vollängentranskripte betrachtet wurde. Diese *in vitro*-Transkripte wurden durch Anlagerung von *psbA*-Antisensetranskripten in Teilbereichen in doppelsträngige RNA überführt. Insbesondere wurde untersucht, inwieweit doppelsträngige Bereiche der *psbA*-mRNA die Stabilität des Vollängentranskriptes erhöhen und ob doppelsträngige RNA überhaupt eine signifikant erhöhte Stabilität in lysierten Chloroplasten aufweist.

In **Abb. 4.16** ist der Aufbau der verwendeten RNA-Konstrukte dargestellt. Radioaktiv markierte *psbA*-Vollängentranskripte wurden mit verschiedenen unmarkierten *psbA*-Antisense-Transkripten zu teilweise doppelsträngigen Konstrukten hybridisiert. Die Hybridisierung erfolgte durch Mischen von Sense- und Antisense RNA in Extrakt-puffer mit 20 mM EDTA, wobei das Antisense-Transkript in dreifachen molaren Überschuß eingesetzt wurde. Die Mischung von Sense- und Antisense-RNA wurde durch kurzes Aufheizen (95 °C) und anschließend langsames Abkühlen über Nacht bis auf Raumtemperatur in teilweise doppelsträngige *psbA*-Vollängen-RNA überführt. Folgende Antisense-Transkripte wurden verwen-

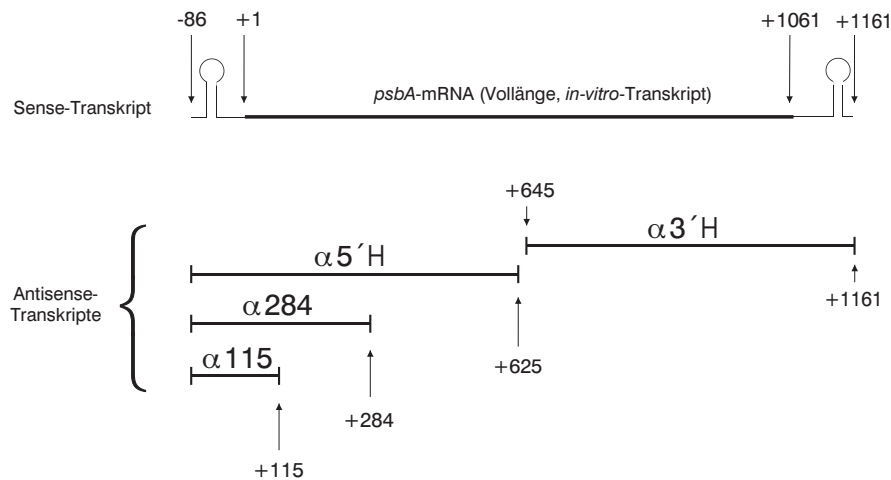


Abbildung 4.16: ***psbA*-antisense-Transkripte zur Herstellung teilweise doppelsträngiger RNA.**— Im oberen Teil ist das Sense-*in-vitro*-Transkript der *psbA*-mRNA (Volllänge) schematisch dargestellt. Die kodierende Region ist hervorgehoben, ebenso sind die postulierten Sekundärstrukturen der 5'- und 3'-untranslatierten Regionen. Der untere Teil zeigt die verwendeten Antisense-*in-vitro*-Transkripte, die durch Hybridisierung mit der *psbA*-sense-RNA zur Ausbildung teilweise doppelsträngiger Transkripte führten. Die Positionsangaben beziehen sich auf den Translationsstartpunkt der *psbA*-mRNA (Zurawski *et al.*, 1982). Die Bezeichnungen der Antisense-Transkripte (5'H, 3'H, 284, 115) waren auch zugleich die Bezeichnungen der hergestellten entsprechenden teilweise doppelsträngigen *psbA*-Vollängenkonstrukte (vgl. Abb.4.21).

det: Die Transkripte *psbA*α5'H und *psbA*α3'H umfaßten jeweils etwa die 5'- bzw. 3'-seitige Hälfte der *psbA*-mRNA. Das Transkript *psbA*α284 entsprach etwa einem Viertel der *psbA*-Vollänge und reichte vom 5'-Ende bis zur Position +284. Das kürzeste Antisense-Transkript war *psbA*α115, das komplementär zur 5'-Region bis zur Position +115 war.

Die **Abb. 4.17** das Ergebnis eines Zerfallsexperimentes mit teilweise doppelsträngigen *in vitro*-Transkripten: Die RNA-Konstrukte wurden wie im Methoden-Teil (Kap. 3.2.4) beschrieben hergestellt und mit lysierten Chloroplasten (5 µg/µl Proteingehalt) inkubiert. Die Endkonzentration der *psbA*-Transkripte betrug 5 fmol/µl. Die erfolgreiche Herstellung von RNA-Doppelsträngen wurde mit einem RNase-Schutz-Experiment kontrolliert: Unter Hochsalzbedingungen (500 mM NaCl) wird doppelsträngige RNA von RNase A nicht angegriffen, wohl aber einzelsträngige RNA. Nach Inkubation der Antisense-Konstrukte in Gegenwart von RNase A und 500 mM NaCl bleiben die doppelsträngigen Bereiche der Transkripte geschützt und lassen sich im denaturierenden Elektrophoresegelel nachweisen.

Teil A des Experimentes zeigt RNA-Zerfallsreihen in Abwesenheit von freiem Magnesium, das durch Zugabe von 20 mM EDTA entfernt wurde. Es zeigt sich, daß *psbA*-Vollängentranskripte, die etwa zur Hälfte doppelsträngig vorliegen (Konstrukte α3'H und α5'H) im Vergleich zur einzelsträngigen Kontrolle deutlich stabiler sind. Dieser stabilisierende Effekt des doppelsträngigen Anteils im Transkript nimmt bei den Konstrukten mit kürzeren Doppelstrang-

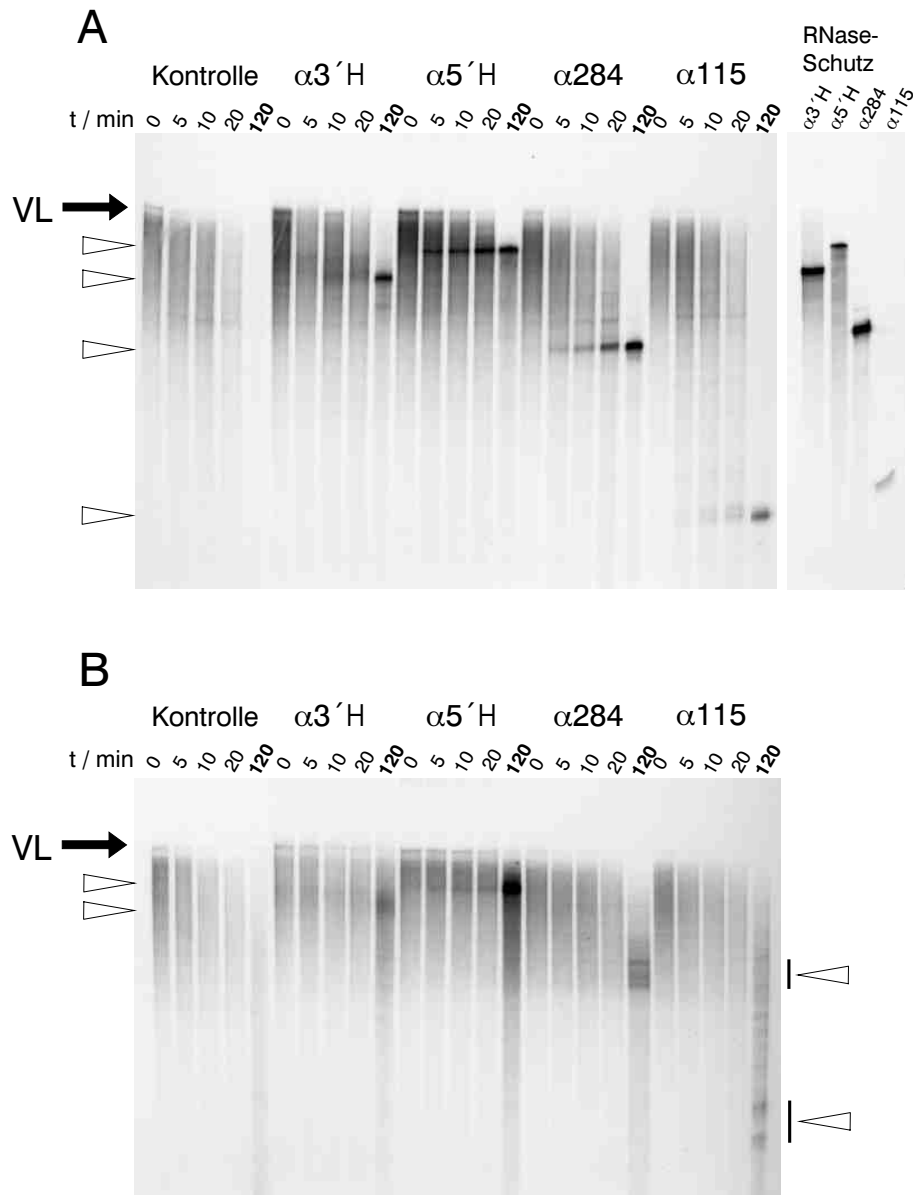


Abbildung 4.17: **Bedeutung der mRNA-Struktur für den mRNA-Abbau *in vitro*.** — **A:** Analyse der Degradation *in vitro* transkribierter und teilweise doppelsträngiger *psbA*-Vollängen-RNA gemäß der Beschreibung in Kap. 3.3.3. Lysierte Chloroplasten (5 mg/ml Protein) wurden in Extrakt-puffer in **Gegenwart von 20 mM EDTA ohne zugesetztes $MgCl_2$** inkubiert. Die RNA-Zerfallsreihe wurde durch Zugabe von ^{32}P -markierter teilweise doppelsträngiger *psbA*-RNA (0,5 fmol $\equiv$ 500 cpm Vollängen-Transkript pro μl Chloroplasten-lysat) gestartet. Nach den angegebenen Zeitpunkten wurde aus je 20 μl Lysat die RNA (ca. 10000 cpm Aktivität) präpariert und auf einem 5 %igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Als Molekulargewichtsstandard dienen *in vitro*-Transkripte bekannter Länge. — RECHTS: Ergebnis des RNase-Schutz-Experimentes (siehe Kap. 3.2.4) zur Kontrolle der erfolgreichen Hybridisierung von Sense- und Antisense-RNA zum teilweise doppelsträngigen Konstrukt. — **B.** Gleiches Experiment wie unter A, aber mit **Zusatz von 25 mM $MgCl_2$** zum Extrakt-puffer (der bereits 20 mM EDTA enthält). — Die Pfeile zeigen die Akkumulation von Fragmenten des markierten *psbA*-Sense-Transkriptes während der Degradation der Volllänge (VL) an.

bereichen, $\alpha 284$ und $\alpha 115$, ab. Im letzteren Fall ist keine signifikante Stabilisierung der Transkript-Vollänge gegenüber der Kontrolle zu erkennen. In allen Zerfallsreihen wird die Transkript-Vollänge innerhalb von 20 min nahezu vollständig abgebaut; dabei zeigt sich, daß die doppelsträngig vorliegenden Bereiche akkumulieren. Die Akkumulation setzt sich fort, wenn die Inkubationszeit auf zwei Stunden ausgedehnt wird. Nach dieser Zeit ist einzelsträngige RNA vollständig degradiert worden, wie das Kontrollexperiment ausweist. Doppelsträngige RNA ist in lysierten Chloroplasten allerdings weitgehend abbauresistent. Bei näherer Betrachtung der Akkumulation der doppelsträngigen Transkriptfragmente zeigt sich, daß das Verhalten des Konstruktes $\alpha 3'H$ von den Konstrukten mit 5'-seitigen Doppelstrangbereichen abweicht: Das stabile $\alpha 3'H$ -Produkt erscheint zunächst als diffuse Bande leicht oberhalb der Position des nach 120 Minuten Inkubationszeit klar erkennbaren Degradationsproduktes. Bei den anderen Konstrukten akkumuliert das stabile Zerfallsprodukt unmittelbar als distinkte Bande an zeitlich unveränderter Position. Dies läßt Rückschlüsse auf die am RNA-Abbau beteiligten Nukleasen zu: Nach der derzeitigen Modellvorstellung sind am RNA-Abbau in Chloroplasten höherer Pflanzen Endonukleasen und 3'→5'-Exonukleasen beteiligt. Eine 5'→3'-Exonukleaseaktivität konnte bisher nicht nachgewiesen werden. Damit läßt sich der vorstehende Beobachtung erklären: Transkripte mit 5'-seitigen Doppelstrangbereichen werden durch distale endonukleolytische Schnitte und 3'→5'-exonukleolytischen Angriff abgebaut, wobei insbesondere letzteres zum frühen Auftreten von stabilen RNA-Doppelsträngen mit homogenem 3'-Ende führt. Liegt aber das 3'-Ende geschützt vor (Konstrukt $\alpha 3'H$), so kann ein einheitliches 5'-Ende des Transkriptes nur durch fortschreitende endonukleolytische Schnitte erzeugt werden. Geringfügig voneinander abweichende 5'-Enden des doppelsträngigen Degradationsproduktes führen so zu einer diffusen Bande in der elektrophoretischen Auftrennung.

Teil B zeigt den gleichen Satz von RNA-Zerfallsreihen bei Zusatz von 25 mM $MgCl_2$. Im Vergleich zur Situation in Abwesenheit von freiem Mg^{2+} sind hier alle *psbA*-Transkripte stabiler. Auch hier sind die *psbA*-Konstrukte mit dem höchsten Doppelstranganteil in lysierten Chloroplasten am stabilsten. Die Konstrukte $\alpha 284$ und $\alpha 115$ sind nicht signifikant stabiler als das einzelsträngige Kontroll-Transkript. In Gegenwart von freiem Mg^{2+} akkumulieren die doppelsträngigen Bereiche der *psbA*-Vollängentranskripte im betrachteten Zeitraum von bis zu 120 Minuten nicht zu Produkten einheitlicher Länge. Dies kann darauf hindeuten, daß unter dem Einfluß von Magnesiumionen die einzelsträngigen Bereiche der Transkripte in Strukturen falten, die durch interne Basenpaarungen den Angriff von Nukleasen erschweren. Darüberhinaus ist hier auch eine Magnesium-vermittelte Hemmung von Nukleasen bzw. akzessorischen Proteinen eine mögliche Erklärung.

4.3.3 Ergebnisse zum Mechanismus des *psbA*-mRNA-Abbaus

- Das Muster der beim Abbau der *psbA*-mRNA entstehenden Degradationsintermediate ist in intakten Chloroplasten (*in organello*) und in lysierten Chloroplasten (*in vitro*-Zerfallssystem) weitgehend gleich, wobei der Abbau der mRNA in lysierten Chloroplasten langsamer verläuft als im intakten Organell.
- Der Abbau der *psbA*-mRNA wird *in organello* durch einen oder mehrere endonukleolytische Schnitte innerhalb der 5'-untranslatierten Region eingeleitet. Erst danach kommt es zu weiteren Schnitten innerhalb der kodierenden Region und der 3'-untranslatierten Region, die offenbar keiner genaueren zeitlichen bzw. räumlichen Reihenfolge unterliegen. Dies gilt tendenziell auch für die Situation in lysierten Chloroplasten.
- Doppelsträngige RNA (als *in vitro*-Transkript) wird in lysierten Chloroplasten nicht in meßbarem Maße abgebaut. In Gegenwart von Mg^{2+} wird *in vitro* transkribierte *psbA*-mRNA stabilisiert.

4.4 Einfluß von Mg^{2+} auf die mRNA-Stabilität

In den letzten Jahren konnten eine Reihe von Proteinen in Chloroplasten höherer Pflanzen identifiziert werden, die an die 3'- und 5'-untranslatierten Regionen von mRNAs binden und aufgrund ihrer biochemischen Eigenschaften als Kandidaten für trans-regulatorische Faktoren des mRNA-Metabolismus anzusehen sind (Hsu-Ching & Stern, 1991; Stern & Grissem, 1989; Hayes *et al.*, 1996, Alexander *et al.*, 1998). Bisher konnte jedoch keinem der identifizierten mRNA-Bindeproteine eine genspezifische regulatorische Funktion zugeordnet werden. In dieser Arbeit wurde daher in den im folgenden dargestellten Experimenten der Einfluß von nicht-proteinartigen *trans*-regulatorischen Faktoren auf die differentielle mRNA-Stabilität untersucht. Dabei wurde insbesondere die Wirkung von Magnesium-Ionen betrachtet. Mg^{2+} spielt bei der Ausbildung von RNA-Strukturen eine entscheidende Rolle (zur Übersicht: Misra & Draper, 1998), ferner deuten die Ergebnisse früherer Untersuchungen zur Rolle von Magnesium bei der Regulation von Enzymen des Calvin-Zyklus (Heldt *et al.*, 1973; Krause, 1977) darauf hin, daß die Konzentration von Mg^{2+} in Chloroplasten hoch genug sein könnte, um die Faltung von RNA-Molekülen zu beeinflussen.

Die Wirkung von Mg^{2+} und anderen Ionen auf die Stabilität von RNAs des Chloroplasten wurde mit Hilfe des *in-vitro*-Zerfallssystems (Lysierte Chloroplasten, vgl. Kap. 3.3.3) untersucht. Dieses System hat sich in früheren Arbeiten als geeignet für die Analyse von mRNA-Stabilität erwiesen, da die *in vivo* ablaufenden Prozesse des mRNA-Abbaus (endonukleolytische Schnitte, Prozessierung von Degradationsintermediaten) getreu wiedergegeben werden (Klaff, 1995; Lisitsky *et al.*, 1996/1997). Lysierte Chloroplasten wurden ohne zugesetztes

Magnesium und in Gegenwart von 20 mM EDTA präpariert. Unter diesen Bedingungen ist das freie Mg^{2+} des Chloroplasten nahezu vollständig durch EDTA komplexiert, d. h. die freie Mg^{2+} -Konzentration liegt unterhalb von $1 \mu\text{M}$ (siehe Kap. 4.4.3). In diesem *in vitro*-System kann nun die Konzentration von Magnesium (und anderer Ionen) durch gezielte Zugabe variiert und Effekte auf die RNA-Stabilität per Northern-Analyse beobachtet werden.

4.4.1 Stabilisierung plastidärer RNAs in Gegenwart von Mg^{2+}

Die **Abb. 4.18** zeigt ein RNA-Zerfallsexperiment zum Einfluß von Mg^{2+} und Na^+ auf die Stabilität von RNAs des Chloroplasten: In lysierten Chloroplasten wurde der Abbau der internen RNA über 150 min bei Raumtemperatur verfolgt. Dabei wurde das interne Mg^{2+} des Chloroplasten durch 20 mM EDTA komplexiert und in einer zweiten Reihe der Magnesiumgehalt durch Zugabe von 25 mM MgCl_2 rekonstituiert. Als Kontrolle für reine Ionenstärkeeffekte wurde in einer weiteren Zerfallsreihe dem Chloroplastenlysat 50 mM NaCl zugesetzt. Als Untersuchungsobjekte wurden zwei mRNAs ausgewählt: Die *psbA*-mRNA, die während der Blattentwicklung stabilisiert wird und die *rbcL*-mRNA, die nur eine schwache entwicklungsabhängige Stabilisierung zeigt (Klauff & Gruissem, 1991). Ferner wurden zwei strukturelle RNAs (16S-rRNA und tRNA_{His}) untersucht, die in allen Stadien der Blatt- bzw. Chloroplastenentwicklung als stabil angesehen werden können. Es zeigt sich, daß drei untersuchte RNA-Spezies (*psbA*-mRNA, *rbcL*-mRNA und 16S-rRNA) bei Magnesium-Zugabe deutlich stabilisiert werden, während die tRNA_{His} , die schon ohne zugesetztes Magnesium im *in vitro*-System äußerst stabil ist, keinen Stabilisierungseffekt bei MgCl_2 -Zugabe erkennen läßt. Die Zugabe von NaCl hat offensichtlich keinen Effekt auf die Stabilität aller untersuchten RNAs. Dies deutet darauf hin, daß die durch Magnesium vermittelte RNA-Stabilisierung nicht durch einen reinen Ionenstärkeeffekt verursacht wird. Ebenso kann eine spezifische RNA-stabilisierende Wirkung von Chloridionen ausgeschlossen werden. Die Wirkung von Magnesium auf die RNA-Stabilität zeigt sich in diesem Experiment nicht als spezifisch für bestimmte RNA-Spezies; - im Fall der tRNA_{His} kann zwar auf Grund der inhärenten hohen Stabilität dieser RNA hier keine weitere Magnesium-vermittelte Stabilisierung gezeigt werden, eine mögliche Stabilisierung durch Mg^{2+} ist damit allerdings nicht ausgeschlossen.

4.4.2 Titration der RNA-Stabilität mit Mg^{2+}

Um die Spezifität der Magnesium-vermittelten Stabilisierung für bestimmte RNA-Spezies zu analysieren, wurde der experimentelle Ansatz verfeinert. Auf der Basis eines RNA-Zerfallsexperimentes ähnlich wie in Kap. 4.4.1 dargestellt, wurde die Inkubationszeit des Chloroplastenlysates ausgewählt, bei der die Unterschiede in den Spiegeln der untersuchten RNAs im Vergleich der Situation mit und ohne zugesetztes MgCl_2 maximal waren. Eine Inkubationszeit von 150 Minuten erwies sich diejenige, bei der der RNA-Stabilisierungseffekt am

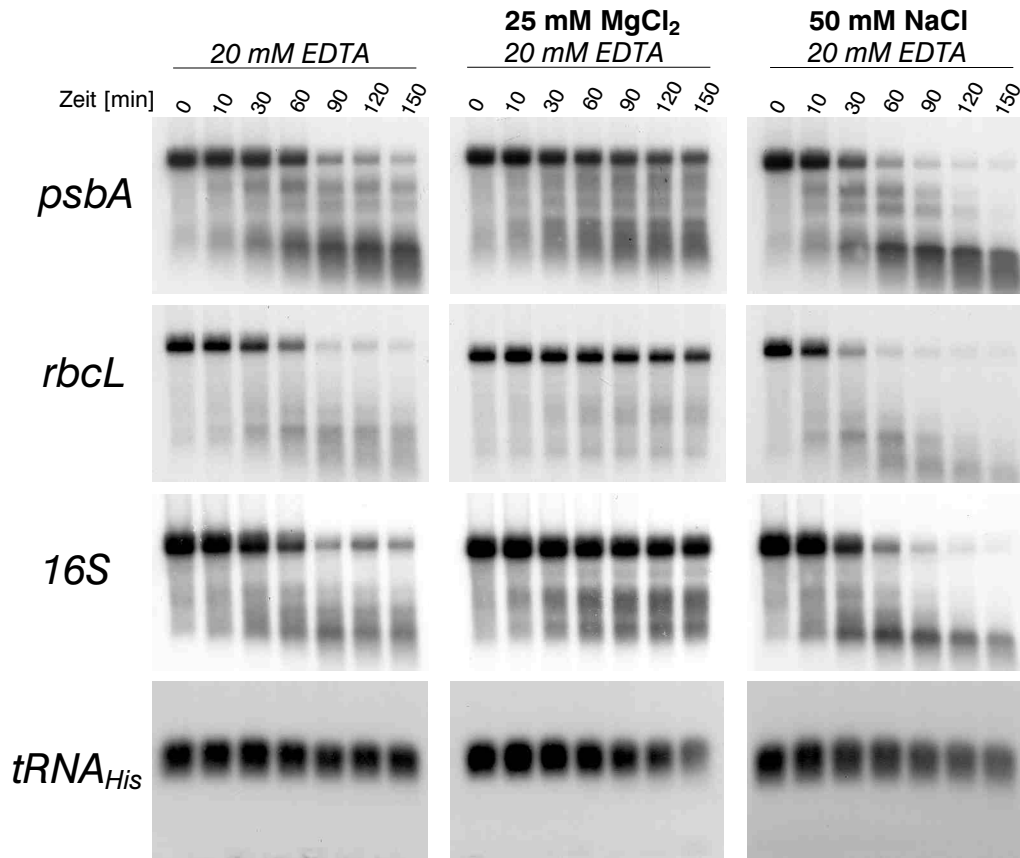


Abbildung 4.18: **Stabilisierung plastidärer RNAs durch Magnesium *in vitro*.** Die Degradation endogener RNAs des Chloroplasten wurde in lysierten Chloroplasten beobachtet. Das Chloroplastenlysats (5 mg/ml Protein) wurde in Gegenwart von 20 mM EDTA präpariert und ohne weitere Behandlung bzw. nach Zugabe von 25 mM MgCl₂ oder 50 mM NaCl bei Raumtemperatur (23 °C) inkubiert. Pro Zeitpunkt wurden 2 µg plastidäre Gesamt-RNA präpariert und nach Auftrennung in einem 1,2 %igen denaturierenden Agarosegel einer Northern-Analyse unterzogen. Auf der linken Seite sind die durch spezifische Oligonukleotidsonden nachgewiesenen RNA-Spezies angegeben.

deutlichsten sichtbar war. Proben des Chloroplastenlysates (mit 20 mM EDTA präpariert) wurden mit steigenden Konzentrationen an zugesetztem MgCl_2 für 150 Minuten inkubiert und die Spiegel an intakter Vollängen-RNA per Northern-Analyse bestimmt. Der Start-Zeitpunkt des RNA-Zerfallsexperimentes diente als Vergleichswert für das Ausgangsniveau der RNA-Spiegel. Wie in **Abb. 4.19** gezeigt, hat Magnesium eine RNA-spezifische stabilisierende Wirkung. Die 16S-rRNA und mehr noch die tRNA_{His} werden bereits bei niedrigen Konzentrationen an zugesetztem MgCl_2 (2,5 – 5,0 mM) stabilisiert. Dagegen zeigt sich für die *psbA*-mRNA erst bei 15 mM zugesetztem MgCl_2 eine deutliche Stabilisierung. Die *rbcL*-mRNA zeigt oberhalb von 10 - 12,5 mM MgCl_2 eine klar erkennbar höhere Stabilität. Neben den „Übergangsbereichen“ der RNA-Stabilisierung, die bei den untersuchten RNA-Spezies offensichtlich bei unterschiedlichen Magnesium-Konzentrationen liegen, zeigen die Stabilisierungsprofile der verschiedenen RNAs auch unterschiedliche qualitative Charakteristika. So nimmt die Stabilität der *rbcL*-mRNA bei steigender MgCl_2 -Konzentration eher allmählich zu, während in Fall der *psbA*-mRNA ein deutlicher Übergang vom instabilen zum stabilen Zustand erkennbar ist.

4.4.3 Konzentrationen von freiem Mg^{2+} in RNA-Zerfallstitrationen

Magnesium-abhängige „RNA-Zerfallstitrationen“, wie sie in Kap. 4.4.2 gezeigt wurden, können quantitativ ausgewertet werden, wenn für die einzelnen MgCl_2 -Titrationspunkte die Konzentration des freien Mg^{2+} bekannt ist. Damit ergab sich die Notwendigkeit, die Konzentration freier Magnesiumionen in lysierten Chloroplasten zu messen. Zu diesem Zweck wurde eine potentiometrische Methode zur Magnesium-Konzentrationsbestimmung etabliert, die ursprünglich für die Bestimmung der freien Mg^{2+} -Konzentration im Rahmen humanphysiologischer Fragestellungen von McGuigan und Mitarbeitern entwickelt wurde (Zhang *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1997; Lüthi *et al.*, 1997). Die Bestimmung der Konzentration an freiem d. h. chemisch aktivem Mg^{2+} in einer Lösung erfolgt mittels einer Magnesium-spezifischen Makroelektrode. Das elektrische Potential dieser Elektrode, das mit dem Voltmeter eines konventionellen pH-Meßgerätes bestimmt werden kann, ist gemäß der Nernst'schen Gleichung dem Logarithmus der Konzentration an freiem Mg^{2+} proportional. Für die Magnesiummessung mußte das Chloroplastenlysate durch Zentrifugation von Membranbestandteilen befreit werden, außerdem erwies sich auch eine anschließende Ultrafiltration durch CENTRICON-Röhrchen mit 30 kDa Ausschlußgröße als notwendig, um alle Bestandteile des Extraktes zu entfernen, die mit der Magnesiumelektrode kreuzreagieren konnten. Die **Abb. 4.20A** zeigt einer Eichkurve der Magnesiumelektrode: Der Verlauf des Elektrodenpotentials folgt in einem Bereich von 0,15 bis 20 mM Mg^{2+} linear dem Logarithmus der Magnesiumkonzentration (pMg).

In **Abb. 4.20B** ist die Konzentration an freiem Mg^{2+} in Abhängigkeit von der nominalen Konzentration des zugesetzten MgCl_2 für zwei unabhängig präparierte Chloroplastenlysate dargestellt. Eine MgCl_2 -Zugabe von bis zu 5 mM führt keiner Erhöhung der freien Magnesi-

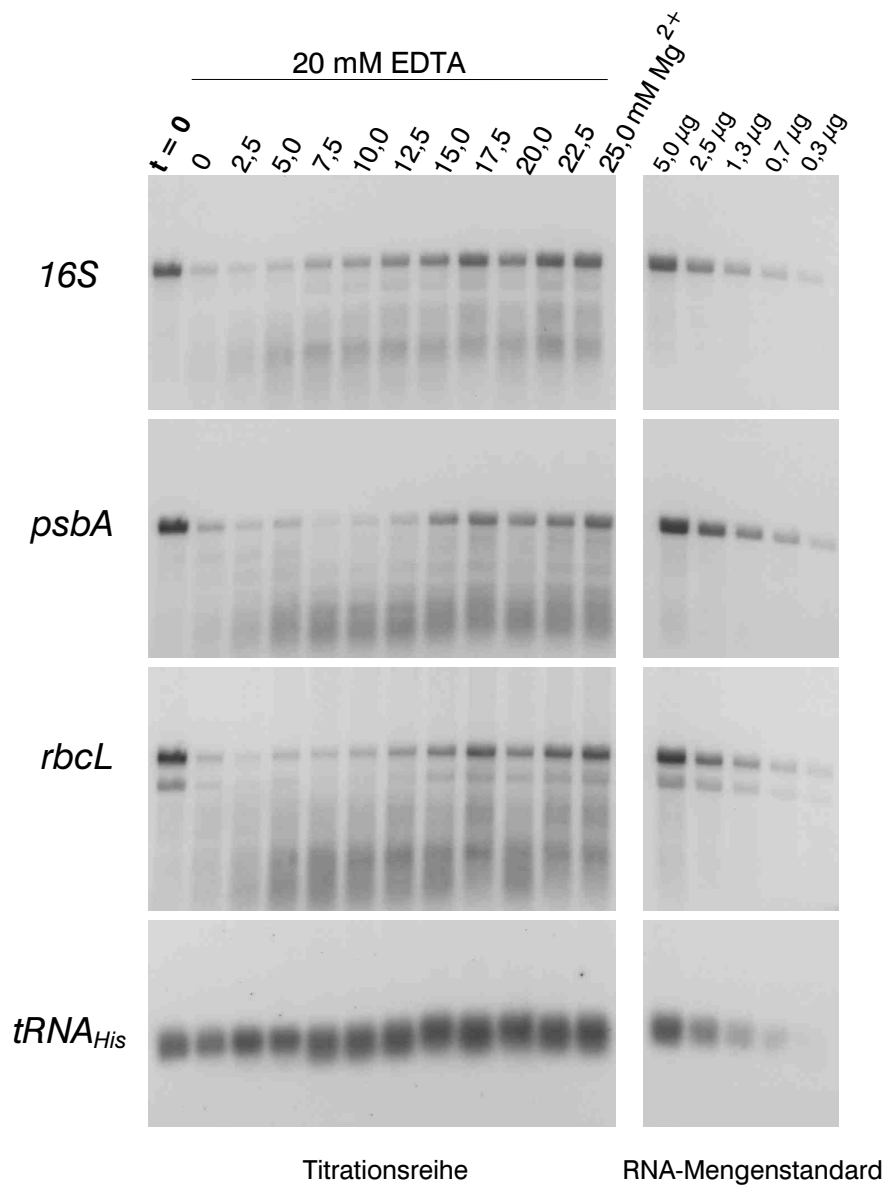


Abbildung 4.19: **Titration der Mg^{2+} -abhängigen RNA-Stabilisierung in lysierten Chloroplasten.** Chloroplastenlysate (5 mg/ml Protein) wurde in Gegenwart von 20 mM EDTA präpariert und für 150 min bei Raumtemperatur (23 °C) inkubiert. Zu Beginn des RNA-Zerfallsexperimentes wurde $MgCl_2$ in den angegebenen Konzentrationen zugesetzt. $t = 0$: Kontrolle der RNA-Spiegel zu Beginn der Inkubation. Für jede Probe wurden 2 µg Chloroplasten-RNA präpariert und einer quantitativen Northern-Analyse unterzogen. Auf der linken Seite sind die durch spezifische Oligonukleotidsonden nachgewiesenen RNA-Spezies angegeben. — Rechts sind die Signale eines in der Northern-Analyse mitverarbeiteten RNA-Mengenstandards dargestellt - dieser diente der Kontrolle des quantitativen RNA-Nachweises. — Die Bande unterhalb des *rbcL*-mRNA-Signals ist auf unvollständig entfernte *psbA*-spezifische Sonde zurückzuführen.

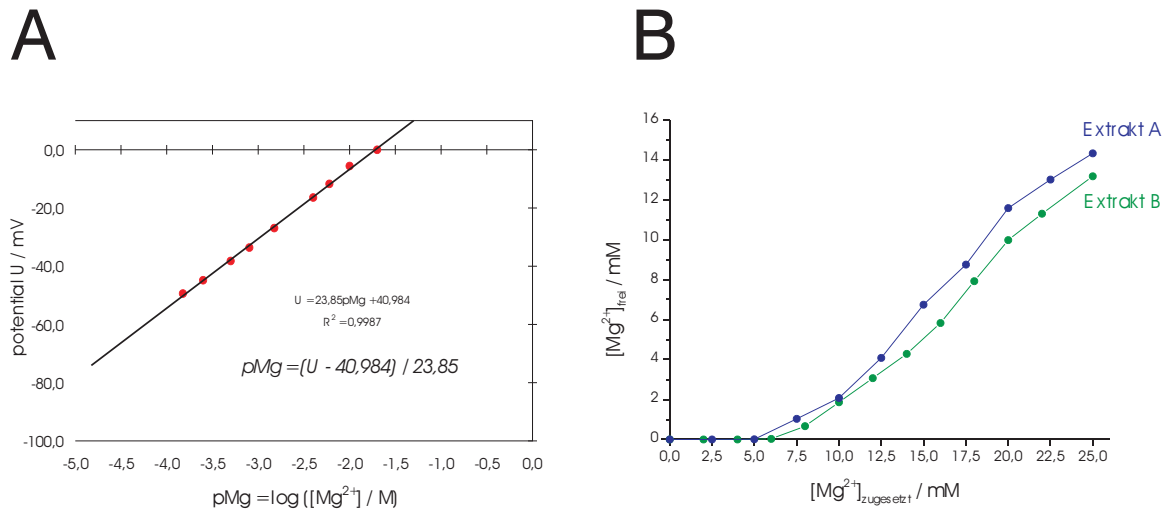


Abbildung 4.20: **Potentiometrische Bestimmung der freien Mg^{2+} -Konzentration in RNA-Zerfallstitrationen.** A: Eichkurve. pMg ($\equiv$ negativer dekadischer Logarithmus der Mg^{2+} -Konzentration) ist gegen das Elektrodenpotential U aufgetragen. Die Kalibrierung erfolgte im Bereich von 20 – 0,15 mM $MgCl_2$. — B: Bestimmung der Konzentration an freiem Mg^{2+} als Funktion des im Rahmen einer RNA-Zerfalltitration (Abb. 4.19) zugesetzten Mg^{2+} in lysierten Chloroplasten (vor einem Hintergrund von 20 mM EDTA).

umkonzentration, die über den micromolaren Bereich hinausgeht. Hier wird offenbar zunächst das zugefügte Magnesium durch das vorhandene EDTA komplexiert. Bei höheren Konzentrationen an zugesetztem $MgCl_2$ ergibt sich ein annähernd linear ansteigender Verlauf der Konzentration an freiem Mg^{2+} .

4.4.4 Magnesium-abhängige RNA-Stabilisierungsprofile

Die Bestimmung der freien Mg^{2+} -Konzentration in Chloroplastenlysaten ermöglichte die quantitative Auswertung von RNA-Zerfallstitrationen hinsichtlich der Magnesium-abhängigen Stabilisierungsprofile. Die Intensitäten der RNA-Signale der in Kap. 4.4.2 gezeigten Northern-Analysen wurden densitometrisch bestimmt. Dabei wurde die Menge der nach Ablauf der Inkubationszeit der lysierten Chloroplasten noch intakten RNA als Prozent des Anfangswertes (Start der RNA-Zerfallsexperimentes) ausgedrückt und gegen die Konzentration an freiem Mg^{2+} aufgetragen. Die bereits in Kap. 4.4.2 qualitativ beschriebenen Unterschiede in den RNA-Stabilisierungsprofilen werden durch die quantitative Auswertung bestätigt (**Abb. 4.21**): Bei der $tRNA_{His}$ folgt das Magnesium-abhängige Stabilisierungsprofil einer sehr steilen Sättigungskurve, einen qualitativ ähnlichen, wenn auch deutlich flacheren Kurvenverlauf zeigt die Stabilisierung der 16S-rRNA und der $rbcL$ -mRNA. Das Stabilisierungsprofil der $psbA$ -mRNA nimmt hier eine Sonderstellung ein: Die Stabilisierung der mRNA folgt

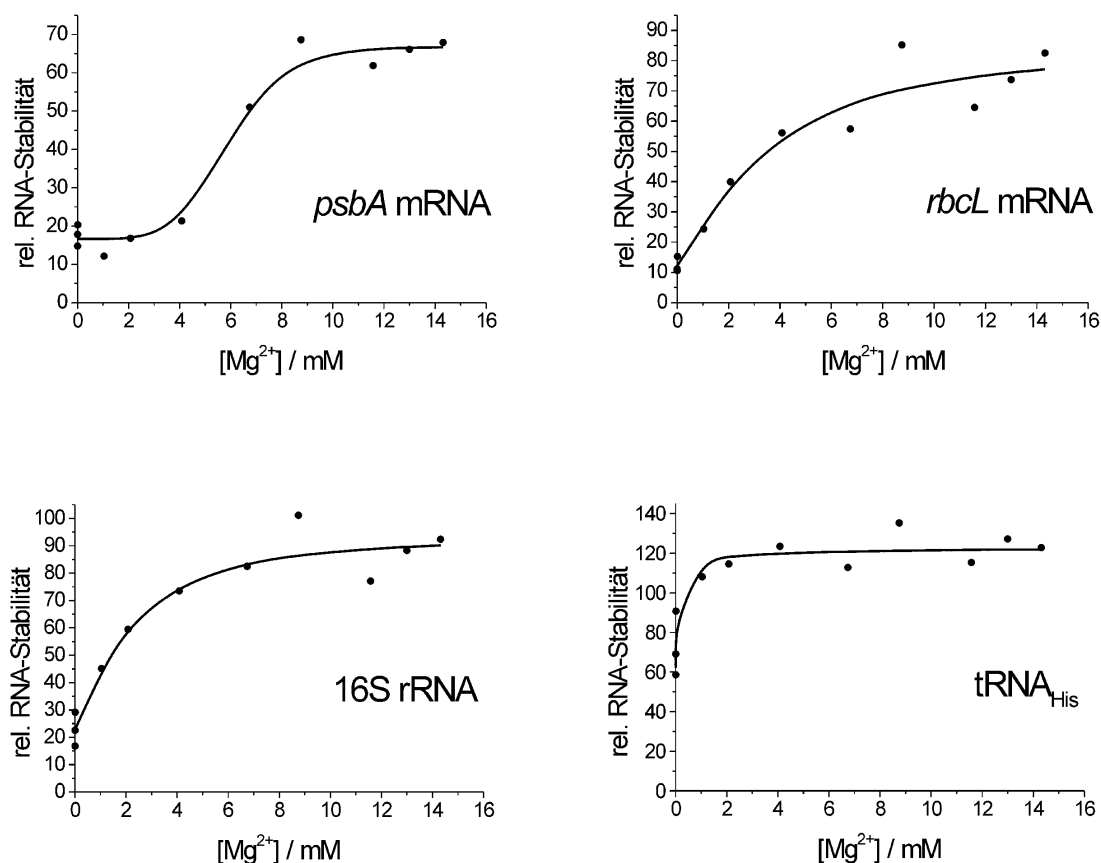


Abbildung 4.21: Mg^{2+} -abhängige RNA-Stabilitätsprofile *in vitro*. Die im Rahmen der quantitativen Northernanalyse einer RNA-Stabilitätstitration (Abb. 4.19) gewonnenen Daten über die relativen RNA-Mengen wurden als Funktion der Magnesiumkonzentration dargestellt. Dabei war die relative RNA-Stabilität die Signalintensität nach der Inkubation der lysierten Chloroplasten, die als Prozent der bei $t = 0$ vorhandenen RNA-Spiegels ausgedrückt wurde. Den Daten wurde eine Funktion auf der Grundlage des Hill'schen Algorithmus für die Beschreibung der Bindung kleiner Liganden an ein Makromolekül angepaßt (Cantor & Schimmel, 1980). Dabei wurde „Bindung“ durch „relative RNA-Stabilität“ ersetzt. Die modifizierte Hill-Funktion lautet: $S([Mg^{2+}]) = S_0 + (S_{max} - S_0) \cdot \frac{[Mg^{2+}]^n}{K^n + [Mg^{2+}]^n}$, mit $S \equiv$ RNA-Stabilität in relativen Einheiten als Funktion der Magnesiumkonzentration, $S_0 \equiv$ RNA-Stabilität bei 20 mM EDTA ohne zugesetztes Mg^{2+} („Grundstabilität“), $S_{max} \equiv$ maximale RNA-Stabilität, $n \equiv$ Hill-Koeffizient, $K \equiv [Mg^{2+}]$ bei halbmaximaler RNA-Stabilität.

bei steigender Mg^{2+} -Konzentration einem sigmoiden Verlauf; bis zu einem Magnesiumspiegel von 3 – 4 mM nimmt die Stabilität kaum zu, um bei einer weiteren Zunahme der Mg^{2+} -Konzentration sehr abrupt anzusteigen, wobei schon ab 10 mM Mg^{2+} ein Sättigungsniveau erreicht wird.

Um die Wirkung von Magnesium auf die Stabilität der untersuchten RNA-Spezies qualitativ und quantitativ zu charakterisieren, wurden den Meßwerten Funktionen auf der Grundlage eines modifizierten Hill-Algorithmus angepaßt. Die Hill-Funktion beschreibt die Bindung von Liganden an ein Makromolekül (Cantor & Schimmel, 1980). Für die hier vorliegende Situation, bei der nicht die Bindung von Magnesiumionen an RNA, dafür aber die Wirkung von Mg^{2+} auf die RNA-Stabilität betrachtet wird, wurde die Hill-Funktion modifiziert:

- **Hill-Funktion:** $f = \frac{[L]^n}{K^n + [L]^n}$

$f \equiv$ Anteil besetzter Bindeplätze auf dem Makromolekül

$n \equiv$ Hill-Koeffizient (bei kooperativer Bindung: $n \geq 1$)

$L \equiv$ Konzentration des freien Liganden

$K \equiv$ apparente Bindekonstante für miteinander interagierende Bindeplätze

- **modifizierte Hill-Funktion:** $S([Mg^{2+}]) = S_0 + (S_{max} - S_0) \cdot \frac{[Mg^{2+}]^n}{K^n + [Mg^{2+}]^n}$

$S \equiv$ RNA-Stabilität in relativen Einheiten als Funktion der Magnesiumkonzentration

$S_0 \equiv$ RNA-Stabilität bei 20 mM EDTA / kein zugesetztes Mg^{2+} („Grundstabilität“)

$S_{max} \equiv$ maximale RNA-Stabilität

$n \equiv$ Hill-Koeffizient

$K \equiv [Mg^{2+}]$ bei halbmaximaler RNA-Stabilität

Die Auswertung der Hill-Koeffizienten und der Magnesiumkonzentration bei halbmaximaler RNA-Stabilisierung ergibt folgendes Bild (Tabelle 4.3): Die *psbA*-mRNA wird durch Magnesium in stark kooperativer Weise stabilisiert: ca. 7 Magnesiumionen pro mRNA-Molekül wirken in einem Schritt, um die RNA zu stabilisieren; diese Kooperativität der Magnesium-Wirkung ist für keine andere der untersuchten RNAs festzustellen. Darüberhinaus zeigt sich für die *psbA*-mRNA mit 6 mM Mg^{2+} die höchste Mg^{2+} -Konzentration der halbmaximalen Stabilisierung.

Die präsentierten Daten zeigen, daß in Chloroplasten die Anwesenheit von freiem Magnesiumionen für die Ausbildung stabiler RNAs *in vitro* notwendig ist. Darüber hinaus zeigen

	Hill-Koeffizient	$[Mg^{2+}]$ bei halbmaximaler Stabilisierung
16S-rRNA	$1,4 \pm 0,7$	2 mM
tRNA _{His}	$0,4 \pm 0,4$	3 μ M
rbcL-mRNA	$1,4 \pm 0,7$	3 mM
psbA-mRNA	$7,3 \pm 2,6$	6 mM

Tabelle 4.3: **Bestimmung der Hill-Koeffizienten.** — Die ursprüngliche Hill-Funktion $f = \frac{[L]^n}{(K^n + [L]^n)}$, mit $f \equiv$ Anteil besetzter Bindeplätze auf dem Makromolekül, $n \equiv$ Hill-Koeffizient (bei kooperativer Bindung: $n \geq 1$), $L \equiv$ Konzentration des freien Liganden, $K \equiv$ apparente Bindekonstante für miteinander interagierende Bindeplätze, wurde für die Beschreibung der Stabilitätsprofile modifiziert: $S([Mg^{2+}]) = S_0 + (S_{max} - S_0) \cdot \frac{[Mg^{2+}]^n}{K^n + [Mg^{2+}]^n}$, mit $S \equiv$ RNA-Stabilität in relativen Einheiten als Funktion der Magnesiumkonzentration, $S_0 \equiv$ RNA-Stabilität bei 20 mM EDTA ohne zugesetztes Mg^{2+} („Grundstabilität“), $S_{max} \equiv$ maximale RNA-Stabilität, $n \equiv$ Hill-Koeffizient, $K \equiv [Mg^{2+}]$ bei halbmaximaler RNA-Stabilität.

plastidäre RNAs in ihrer Mg^{2+} -abhängigen Stabilisierung qualitativ und quantitativ unterschiedliche Eigenschaften, wobei die relevanten Magnesiumkonzentrationen im Bereich physiologischer Werte liegen (Heldt *et al.*, 1973; Krause, 1977; Barber, 1976). Da die *psbA*-mRNA bezüglich ihrer Stabilität kooperativ auf Änderungen der Mg^{2+} -Konzentration reagiert, genügen bei einem Magnesiumspiegel von 6 mM vergleichsweise kleine Änderungen der Magnesiumkonzentration im Stroma des Chloroplasten, um die Stabilität der *psbA*-mRNA drastisch zu beeinflussen.

4.5 Magnesium-Effekt: mRNA-Degradationsmuster

Die zuvor beschriebene Methode der Analyse von mRNA-Zerfallsprodukten wurde auch herangezogen, um Einblicke in den Mechanismus der Magnesium-induzierten mRNA-Stabilisierung zu erhalten. Die *psbA*-mRNA wird in Spinat durch Magnesium in besonderem Maße stabilisiert, wobei die Stabilisierung im Bereich physiologischer Mg^{2+} -Konzentrationen stattfindet und Mg^{2+} -Ionen offenbar stark kooperativ wirken. Mit Hilfe der hochauflösenden Northernanalyse sollte gezeigt werden, ob der stabilisierende Effekt der Mg^{2+} -Ionen definierte endonukleolytische Schnitte der mRNA beeinflusst oder eher generell auf die Spaltungsrate wirkt. Dabei wurde dem 5'-Bereich der *psbA*-mRNA besondere Aufmerksamkeit gewidmet, da hier – insbesondere in der 5'-untranslatierten Region – die den Abbau des RNA einleitenden endonukleolytischen Schnitte erfolgen, wie bereits in Kap. 4.3 gezeigt werden konnte.

4.5.1 Mg^{2+} -abhängige Degradationsmuster der *psbA*-mRNA *in vitro*

Abb. 4.22 zeigt das Ergebnis eines mRNA-Zerfallsexperimentes. Spinatchloroplasten wurden aus reifen Blättern präpariert und wie beschrieben in Gegenwart von 20 mM EDTA lysiert. Ein Teil der lysierten Chloroplasten wurde mit 25 mM MgCl_2 versetzt, um den für reife Blätter typischen physiologischen Gehalt an freiem Mg^{2+} wiederherzustellen. Die lysierten Chloroplasten wurden bei Raumtemperatur inkubiert, um RNA-Degradationsreaktionen ablaufen zu lassen. Nach den in der **Abb. 4.22** angegebenen Inkubationszeiten wurde die RNA präpariert und der hochauflösenden Northern-Analyse unterzogen. Dabei wurden die gleichen Oligonukleotidsonden wie bei der Untersuchung des Abbaumechanismus der *psbA*-mRNA verwendet. Teil A der Abbildung zeigt die Signale der vier eingesetzten Sonden, Teil B zeigt schematisch die Positionen, die von den jeweiligen Oligonukleotidsonden auf der *psbA*-mRNA erkannt werden.

Die Signale der drei Sonden, die im Bereich des 5'-Endes der mRNA binden (*psbA* -86, *psbA* -46, *psbA* +13) zeigen an, daß in Gegenwart von Magnesiumionen die Spaltungsaktivität generell reduziert ist. Dennoch lassen sich in Abwesenheit von Mg^{2+} einige Degradationsfragmente nachweisen, die im Anwesenheit von Mg^{2+} nicht auftreten (in **Abb. 4.22** rot markiert). Die Längen dieser Fragmente, die im Bereich von ca. 70 bis ca. 200 nt liegen, lassen darauf schließen, daß diese Zerfallsprodukte durch Schnitte innerhalb des 5'-Bereichs der *psbA*-mRNA (bis ca. Position +190) erzeugt werden. Im Bereich höherer Molekulargewichte (größer als 500 nt) ist das Signal eines mRNA-Fragmentes nachweisbar, das nur in Gegenwart von Mg^{2+} auftritt (grüne Markierung). Es kann hier aber nicht gezeigt werden, ob dieses Fragment aufgrund von Magnesium-induzierten Schnitten erzeugt wird, oder durch die Magnesium-vermittelte Hemmung von Schnitten im proximalen 5'-Bereich der mRNA. Da dieses Fragment aber auch von der 5'-terminal bindenden Sonde *psbA* -86 erkannt wird, dürfte letzterer Fall zutreffend sein.

Die Signale der Sonde *psbA* +1057, die in der 3'-untranslatierten Region bindet, zeigen keine deutliche generelle Abnahme der Anzahl und Abundanz von Degradationsintermediaten bei Zugabe von Magnesium. Es ist allerdings klar erkennbar, daß einige Zerfallsprodukte der *psbA*-mRNA (rot markiert) bei Zugabe von Magnesium zugunsten von Fragmenten mit anderen Längen (grün markiert) verschwinden. Dies deutet darauf hin, daß Magnesium auch im 3'-Bereich der *psbA*-mRNA das Muster der am Abbau der mRNA beteiligten Schnittstellen verändert.

Insgesamt ist festzustellen, daß Magnesiumionen die Zugänglichkeit definierter Schnittstellen im 5'-Bereich der *psbA*-mRNA hemmen, über die der endonukleolytische Abbau der *psbA*-mRNA eingeleitet wird.

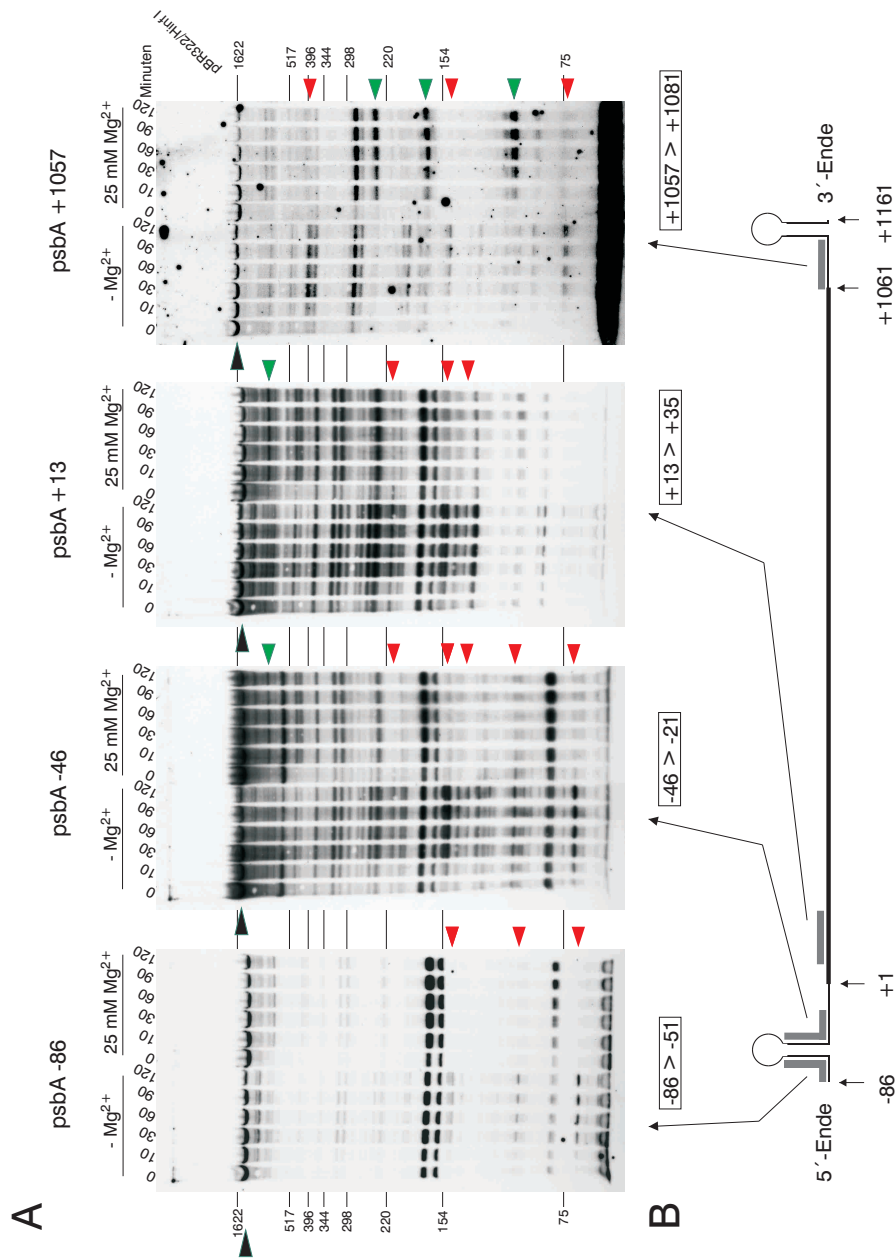


Abbildung 4.22: Abbau der *psbA*-mRNA in lysierten Chloroplasten: Magnesiumeffekt. — **A:** Hochauflösende Northernanalyse des RNA-Abbaus gemäß der Beschreibung in Kap. 3.3.2/3.3.3. Lysierte Chloroplasten wurden in Extrakt-puffer (mit 20 mM EDTA) und in Gegenwart von 25 mM $MgCl_2$ inkubiert. Nach den angegebenen Zeitpunkten wurde plastidäre Gesamt-RNA präpariert und auf einem 5 %igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Als Molekulargewichtsstandard diente der DNA-Marker pBR322/HinfI. **B:** Schematische Übersicht über die Positionen, an denen die verwendeten Oligonukleotidsonden an die *psbA*-mRNA binden. Die kodierende Region der mRNA ist durch eine dickere Linie hervorgehoben, ebenso sind die postulierten Sekundärstrukturen innerhalb der 5'- und 3'-untranslatierten Regionen dargestellt. Die Positionsangaben beziehen sich auf den Translationsstartpunkt (Zurawski *et al.*, 1982). Mg^{2+} -abhängige Änderungen des Fragmentmusters sind farblich gekennzeichnet (vgl. Text Kap. 4.5.1), die Volllänge der *psbA*-mRNA ist schwarz markiert.

4.5.2 Degradationsmuster der *psbA*-mRNA in der Stabilitätstiteration

Die Analyse der Degradationsmuster der *psbA*-mRNA wurde hier im Hinblick auf die Abhängigkeit der Zugänglichkeit distinkter Schnittstellen von der Konzentration an freien Magnesiumionen vertieft. Dazu wurden Titrationsen der RNA-Stabilität in lysierten Chloroplasten mit steigender Magnesiumkonzentration vor dem Hintergrund von 20 mM EDTA – wie bereits in Kap. 4.4.2 beschrieben – durchgeführt. Proben des Chloroplastenlysates (mit 20 mM EDTA präpariert) wurden mit steigenden Konzentrationen an zugesetztem MgCl_2 für 150 Minuten inkubiert und die isolierte RNA einer hochauflösenden Northern-Analyse unterzogen. Der Start-Zeitpunkt des RNA-Zerfallsexperimentes diente als Vergleichswert für das Ausgangsniveau der RNA-Spiegel, insbesondere im Hinblick darauf, ob die nach der Inkubation nachweisbaren Degradationsintermediate schon unter Gleichgewichtsbedingungen in Chloroplasten vorliegen oder Präparationsartefakte darstellen. Es wurden die gleichen Oligonukleotid-Sonden wie in den RNA-Zerfallsreihen (Kap. 4.5.1) verwendet.

Das Ergebnis zeigt die **Abb. 4.23**: Alle eingesetzten Sonden zeigen, daß die Intensität des Signals der vollen Länge der *psbA*-mRNA nach 150 Minuten Inkubation gegenüber dem Nullpunkt stark abgenommen hat. - Die Intensität des Signals der *psbA*-Vollängen-mRNA sollte sich Mg^{2+} -abhängig so verhalten, wie in der in Kap. 4.4.2 dargestellten Stabilitätstiteration. Dies ist hier nicht klar erkennbar, dabei ist jedoch zu bedenken, daß in diesem Experiment, in dem RNA aus einem 5 %igen Polyacrylamidgel auf eine Nylonmembran transferiert wird, bei Fragmentlängen von mehr als 500 nt kein quantitativer Transfer mehr gewährleistet ist.

Die 5'-terminal bindende sonde *psbA* -86 weist neben der Volllänge auch in diesem Experiment zwei Fragmente der Länge von ca. 160/170 nt nach, deren Abundanz mit zunehmender Magnesiumkonzentration zunächst steigt und dann abnimmt. Gleiches gilt auch für ein oder mehrere kleiner Fragmente mit Längen von weniger als 75 nt, die im Gel innerhalb einer Salzfront laufen. Die Sonden *psbA* -46 und *psbA* +13 weisen zahlreiche Degradationsintermediate nach, wobei der Spiegel einiger Intermediate von der Magnesiumkonzentration beeinflusst wird: Vier Fragmente der *psbA*-mRNA (blaue Markierungen – ca. 80 nt, ca. 120 nt, ca. 140 nt und ca. 230 nt) sind nur bei zugesetztem Mg^{2+} von weniger als 7,5 mM nachweisbar, d. h. bei einer freien Mg^{2+} -Konzentration im mikromolaren Bereich (vgl. Kap. 4.3.2 / Abb. 4.20). Eine zweite Gruppe von Fragmenten ist erst oberhalb von 17,5 mM zugesetztem (ca. 8 mM freiem) Mg^{2+} in der Intensität stark herabgesetzt bzw. nicht mehr detektierbar (drei Fragmente: ca. 85 nt, zweimal ca. 145 nt, rot markiert). Eine dritte Gruppe von Degradationsintermediaten (mehrere Fragmente im Bereich von 154 bzw. 220 nt, grün markiert) zeigt mit zunehmender Mg^{2+} -Konzentration auch zunehmende Intensität, wobei diese Fragmente erst oberhalb von 5 mM zugesetztem MgCl_2 , d. h. ab millimolaren freien Mg^{2+} -Konzentrationen detektierbar sind.

Die Analyse der magnesiumabhängigen Stabilisierungsprofile ergab für die *psbA*-mRNA eine

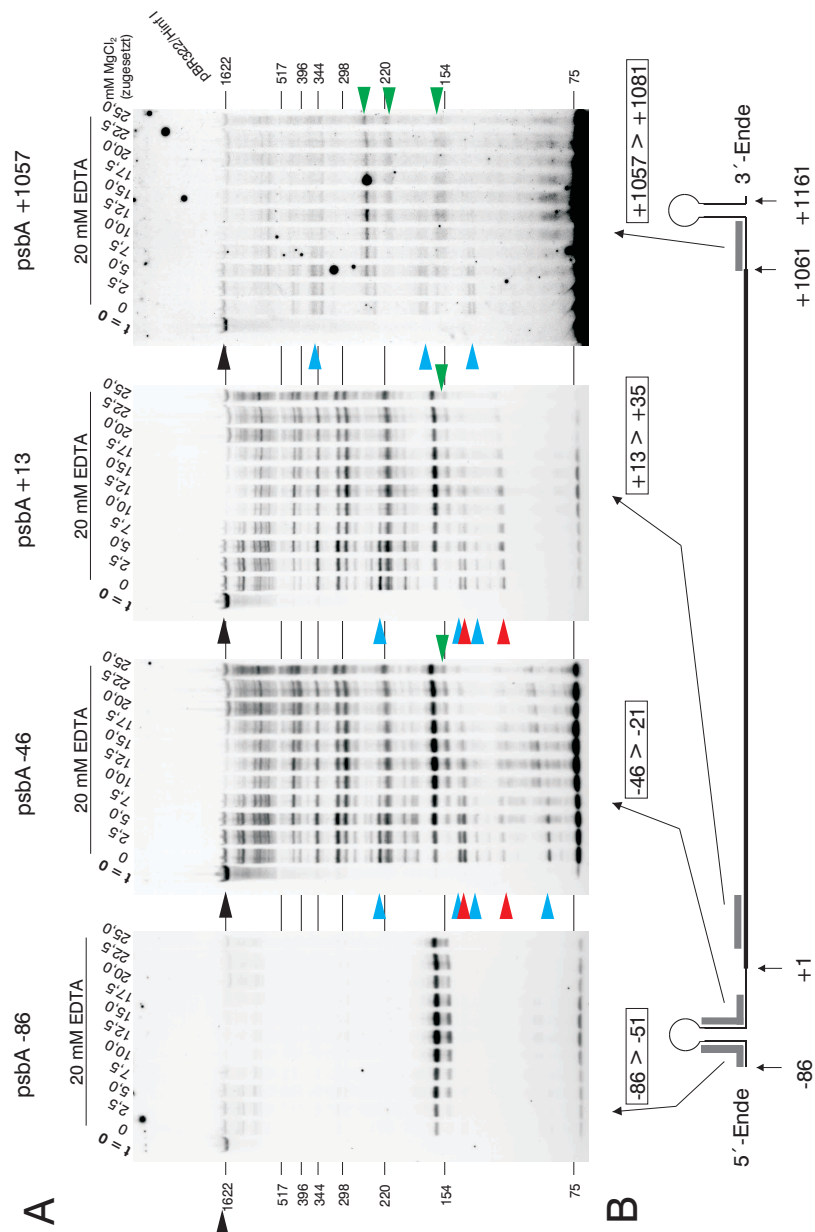


Abbildung 4.23: **Hochoflösende Zerfallanalyse der *psbA*-mRNA in lysierten Chloroplasten (Mg²⁺-Titration).** — **A:** Hochoflösende Northernanalyse des RNA-Abbaus gemäß der Beschreibung in Kap. 3.3.2/3.3.3. Lysierte Chloroplasten wurden in Extrakt-puffer (mit 20 mM EDTA) mit steigenden MgCl₂-Konzentrationen inkubiert. Nach 150 min (bzw. zum Zeitpunkt 0 als Kontrolle) wurde plastidäre Gesamt-RNA präpariert und auf einem 5 %igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Als Molekulargewichtsstandard diente der DNA-Marker pBR322/HinfI. **B:** Schematische Übersicht über die Positionen, an denen die verwendeten Oligonukleotidsonden an die *psbA*-mRNA binden. Die kodierende Region der mRNA ist durch eine dickere Linie hervorgehoben, ebenso sind die postulierten Sekundärstrukturen innerhalb der 5'- und 3'-untranslatierten Regionen dargestellt. Die Positionsangaben beziehen sich auf den Translationsstartpunkt (Zurawski *et al.*, 1982). Mg²⁺-abhängige Änderungen des Fragmentmusters sind farblich gekennzeichnet (vgl. Text Kap. 4.5.1), die Volllänge der *psbA*-mRNA ist schwarz markiert.

hochkooperative Mg^{2+} -induzierte Stabilisierung im Bereich von ca. 6 mM freiem Mg^{2+} . Führt man die Stabilisierung der mRNA auf den Schutz bestimmter endonukleolytischer Schnittstellen zurück, so sind die Schnittstellen, die zur Erzeugung der „zweiten Gruppe“ der genannten Degradationsfragmente führen, Kandidaten für eine Mg^{2+} -abhängige Regulation des mRNA-Abbaus. – Die Wirkung von Magnesium auf diese Schnittstellen liegt genau in dem Mg^{2+} -Konzentrationsbereich, in dem auch die kooperative Stabilisierung der *psbA*-mRNA beobachtet wird.

4.6 Biologische Bedeutung der Mg^{2+} -vermittelten RNA-Stabilisierung in Chloroplasten

Zur Überprüfung der biologischen Relevanz der Mg^{2+} -vermittelten RNA-Stabilisierung in Chloroplasten wurde die Konzentration von freiem Mg^{2+} im plastidären Stroma bestimmt. Der Stromainhalt der Chloroplasten wurde präpariert (Kap. 3.1.1, 3.1.3 / Klein *et al.*, 1988),

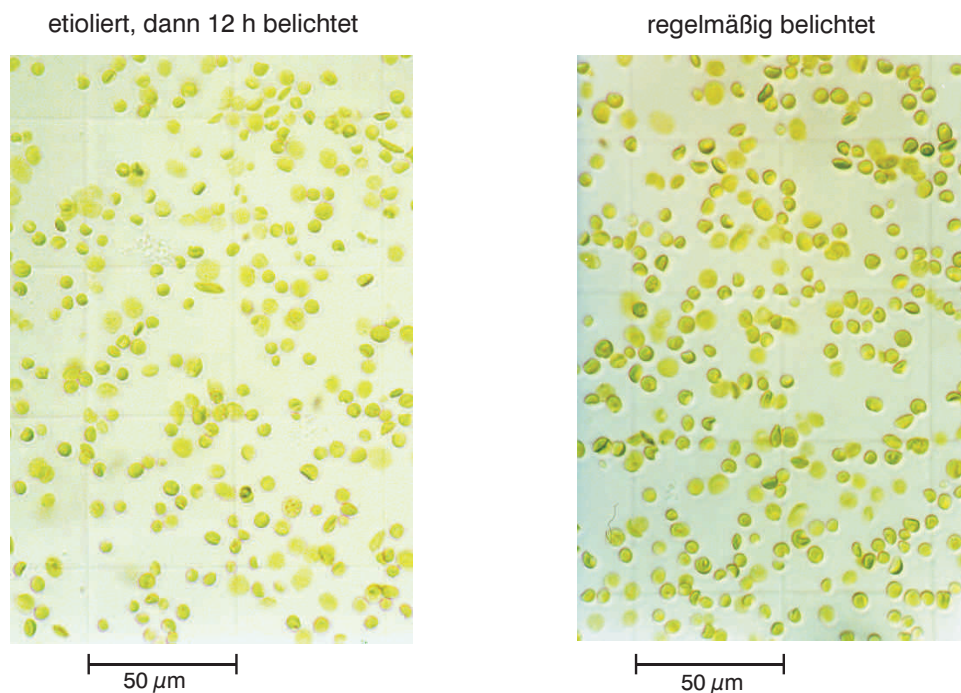


Abbildung 4.24: **Isolierte Chloroplasten.** — LINKS: Chloroplasten, aus 8 Tage alten etiolierten Spinatkeimlingen isoliert, die unmittelbar vor der Chloroplastenpräparation für 12 Stunden belichtet wurden. (junge Chloroplasten) — RECHTS: Chloroplasten, präpariert aus expandierten Spinat-Kotyledonen (reife Chloroplasten). Die verwendeten Keimlinge waren 8 Tage alt und wurden im 12 Stunden Licht/Dunkel-Rhythmus belichtet. Derartige Mikrofotografien waren Grundlage für die Bestimmung der Chloroplastenvolumina.

wobei den verwendeten Puffern weder EDTA noch $MgCl_2$ zugesetzt wurde. Die Stroma-

Fraktion wurde durch CENTRICON-Röhrchen mit einer Ausschlußgröße von 30 kDa ultrafiltriert, um Substanzen abzutrennen, die mit der potentiometrischen Mg^{2+} -Bestimmung interferierten. Die Konzentration des Stromainhaltes wurde so eingestellt, daß 1 ml das Stromavolumen von $8,5 \times 10^8$ Chloroplaasten repräsentierte. Um entwicklungsabhängige Änderungen der freien Mg^{2+} -Konzentration zu untersuchen, wurden die Chloroplasten aus zwei Entwicklungsstadien präpariert: Junge Chloroplasten wurden durch solche repräsentiert, die aus 8 Tage alten für 2 Stunden vorbelichteten etiolierten Spinatkeimlingen isoliert wurden, reife Chloroplasten wurden aus expandierten Kotyledonen von unter konstantem 12 Std. Licht/Dunkel-Rhythmus gewachsenen Keimlingen isoliert.

Die Vermessung von Mikrofotografien der Chloroplasten (Abb. 4.24) nach Klein & Mullet, 1987 zeigte, daß sich daß junge Chloroplasten nach 12 Stunden Belichtung bereits das gleiche Volumen wie reife Chloroplasten besitzen (Abb. 4.24 / Tabelle 4.6); dies wurde für Chloroplasten aus Gerste unter vergleichbaren Bedingungen bereits gezeigt (Klein & Mullet, 1987).

Zunächst wurde die Konzentration an freiem Magnesiumionen in den auf die Chloroplasten-

Entw.- Stufe	Länge l / μm	Breite w / μm	Volumen V / μm^3	$[\text{Mg}^{2+}]_{\text{frei}}/\text{mM}$ Extrakt	$[\text{Mg}^{2+}]_{\text{frei}}/\text{mM}$ Stroma	Chl. mg/ml
jung n = 229	$5,9 \pm 1,2$	$4,8 \pm 0,8$	$72,9 \pm 11,4$	A: 0,33 B: 0,23	A: 4,0 B: 3,0	
reif n = 201	$5,9 \pm 1,0$	$5,0 \pm 0,9$	$73,6 \pm 33,9$	A: 0,63 B: 0,80 C: 0,74 D: 0,75	A: 8,2 B: 9,7 C: 9,0 D: 9,2	3,0 3,3 3,3 3,2

Tabelle 4.4: **Konzentration freier Mg^{2+} -Ionen in Chloroplasten.** — Chloroplasten wurden aus etiolierten Keimlingen isoliert, die zuvor für 12 Stunden belichtet worden waren („jung“) bzw. aus expandierten Kotyledonen von Keimlingen, die im 12 Std. Licht/Dunkel-Zyklus heranwuchsen („reif“). Dargestellt sind die Ergebnisse der Bestimmung der Chloroplastenvolumina nach Klein & Mullet (1987) sowie die Ergebnisse der Magnesiumbestimmungen. n: Zahl der zur Volumenbestimmung vermessenen Chloroplasten. A, B, C, D repräsentieren jeweils unabhängige Chloroplastenpräparationen. Für reife Chloroplasten wurde das Stromavolumen mit $23 \mu\text{l}$ pro mg Chlorophyll angesetzt (Heldt *et al.*, 1973). Für junge Chloroplasten wurde angenommen, daß der Anteil des Stromavolumens am Gesamtvolumen der Gleiche ist wie bei reifen Chloroplasten, so daß hier das Stromavolumen anhand des Chloroplastenvolumens abgeschätzt werden konnte. — Chl. = Chlorophyll

„Konzentration“ normalisierten Stromaextrakten bestimmt. Um nun auf die Konzentration des freien Mg^{2+} im Stromakompartiment der Chloroplasten schließen zu können, mußte das Stromavolumen abgeschätzt werden. Dazu wurde die bereits in früheren Arbeiten etablierte

Beziehung zwischen Chlorophyllgehalt und Stromavolumen in Spinatchloroplasten herangezogen (Heldt *et al.*, 1973): Reife Spinatchloroplasten enthalten 23 μl Stroma pro μg Chlorophyll. D. h. die Kombination aus Magnesiumbestimmung und Chlorophyllbestimmung erlaubte die Abschätzung der Konzentration an freiem Mg^{2+} im Stroma. Diese Beziehung zwischen Stromavolumen und Chlorophyllgehalt wurde auf die Mg^{2+} -Bestimmung in jungen Chloroplasten übertragen, da das Plastidenvolumen konstant war. Es ist dabei anzunehmen, daß der Anteil des Stromavolumens in jungen Chloroplasten eher unterschätzt – und die Mg^{2+} -Konzentration überschätzt – wird, da junge Chloroplasten weniger Thylakoidmembrankomplexe enthalten als reife Chloroplasten.

Es zeigte sich (siehe Tabelle 4.6), daß die Konzentration freier Magnesiumionen während der Chloroplastenreifung um das zweieinhalbfache von 3 – 4 mM (junge Chloroplasten) auf 8 – 10 mM (reife Chloroplasten) ansteigt. Diese Daten der Magnesiumkonzentrationen stimmen mit den wirksamen Magnesiumkonzentrationen der RNA-Stabilitätsprofile in überzeugender Weise überein. Damit ist die *in vitro* beobachtete differentielle Stabilisierung plastidärer RNAs durch Mg^{2+} ein Modell für die entwicklungsabhängige differentielle RNA-Stabilisierung *in vivo*.

Kapitel 5

Diskussion

Die differentielle Regulation der mRNA-Stabilität hat in Chloroplasten höherer Pflanzen entscheidenden Einfluß auf die genspezifische Steuerung von mRNA-Spiegeln und ist damit eine entscheidende Regulationsebene der Genexpression. Im Gegensatz zu Prokaryonten, die sehr kurzlebige mRNAs besitzen, liegen die bisher aus Chloroplasten von Spinat und Gerste bekannten mRNA-Halbwertszeiten im Bereich von Stunden. Im Rahmen dieser Arbeit konnten *in vivo*-Messungen von mRNA-Halbwertszeiten in Tabak und *Arabidopsis* zusammen mit den bereits bekannten Daten zeigen, daß die Grundraten des mRNA-Metabolismus in Angiospermen ähnlich sind. Inhalt dieser Arbeit war eine vertiefte Analyse der der genspezifischen Kontrolle der mRNA-Stabilität zugrunde liegenden Abbaumechanismen mit dem Ziel, ein Regulationsmodell entwerfen zu können. Als Beitrag zum Verständnis des Abbaumechanismus der stabilitätsregulierten *psbA*-mRNA konnte die 5'-untranslatierte Region des mRNA-Moleküls als guter Kandidat für ein *cis*-regulatorisches Element identifiziert werden, darüber hinaus zeigte sich, daß doppelsträngig vorliegende Bereiche der *psbA*-mRNA kein Substrat für den RNA-Abbau in Spinat-Chloroplasten darstellen.

Ein weiteres grundlegendes Ergebnis dieser Arbeit ist die Etablierung der Bedeutung der Konzentration von freien Magnesiumionen für die genspezifische mRNA-Stabilisierung während der Chloroplastenreifung. Die Konzentration von freiem Mg^{2+} im Stroma-Kompartiment steigt während der Chloroplastenreifung deutlich an. *In vitro* führt eine derartige Mg^{2+} -Konzentrationserhöhung zur einer kooperativen und selektiven Stabilisierung der *psbA*-mRNA, die im Verlauf der Blattentwicklung *in vivo* bereits früher nachgewiesen werden konnte. Bei der *psbA*-mRNA kommt es bei Erhöhung der Magnesiumkonzentration zu einer ortsspezifischen Unterdrückung von endonukleolytischen Schnitten während der RNA-Degradation.

5.1 mRNA-Metabolismus in Chloroplasten höherer Pflanzen

Bereits vor einigen Jahren zeigte sich, daß die Halbwertszeiten plastidärer mRNAs bei höheren Pflanzen im Bereich von Stunden liegen und damit im Größenbereich der für pflanzliche cytosolische mRNAs typischen mRNA-Halbwertszeiten (Gutierrez *et al.*, 1999). Trotz ihrer prokaryontischen Herkunft haben Chloroplasten höherer Pflanzen in dieser Hinsicht eukaryontische Eigenschaften übernommen. Die in dieser Arbeit in Tabak und *Arabidopsis* gemessenen mRNA-Halbwertszeiten liegen im Bereich ähnlicher Größen wie sie zuvor in Spinat und Gerste bestimmt wurden (Klauff & Gruissem, 1991, Kim *et al.*, 1993 / siehe Tabelle 5.1).

	<i>psbA</i>	<i>rbcL</i>	<i>psaA/B-rps14</i>	<i>atpB/E</i>
Tabak	≫ 50 h	25,2 ± 5,6 h	4,5 ± 0,7 h	8,0 ± 2,3 h
<i>Arabidopsis</i>	≫ 50 h	14,4 ± 1,9 h	6,5 ± 2,7 h	7,2 ± 1,3 h
Spinat ¹	≈ 10 h	≈ 5 h	nicht bestimmt	nicht bestimmt
Gerste ²	≫ 40 h	≈ 20 h	≈ 8 h	≈ 7 h

Tabelle 5.1: *in vivo* bestimmte Halbwertszeiten von mRNAs reifer Chloroplasten.

¹Daten aus Klauff & Gruissem, 1991. ²Daten aus Kim *et al.*, 1993.

Die *psbA*-mRNA ist in allen untersuchten Pflanzenarten im Rahmen der untersuchten mRNAs die bei weitem stabilste, wobei die *in vivo*-Halbwertszeit der *psbA*-mRNA aufgrund des langsamen Abbaus während der Dauer der mRNA-Zerfallsexperimente nur grob abgeschätzt werden kann. In allen bisher durchgeführten Arbeiten – einschließlich der hier vorliegenden – überstieg die Halbwertszeit der *psbA*-mRNA die Dauer des Experimentes. Die für reife Blätter bestimmten Halbwertszeiten von 50 Stunden und mehr zeigen an, daß die *psbA*-mRNA in reifen Chloroplasten nur mit einer sehr geringen Rate abgebaut wird. Dies dient offenbar dem Erreichen eines hohen mRNA-Spiegels in photosynthetisch aktivem Gewebe, um eine hohe Translationsrate des D1-Proteins zu gewährleisten. Die D1-Proteinmoleküle, deren Funktion für den Wasserspaltungsapparat des Photosystems II unerlässlich ist, werden im Zuge des photosynthetischen Elektronentransportes beschädigt und müssen daher mit hoher Effizienz nachsynthetisiert werden (Melis, 1999). Die *rbcL*-mRNA ist nicht so abundant wie die *psbA*-mRNA und auch ihre *in vivo*-Stabilität ist deutlich geringer. Die wesentlich weniger abundanten mRNAs des *psaA/B-rps14*- und *atpB/E*-Operons zeigen auch eine ent-

sprechend geringere Stabilität *in vivo*. Die Abstufung der mRNA-Stabilität in der Reihenfolge $psbA > rbcL > atpB/E \approx psaA/B - rps14$ ist bei allen bisher untersuchten höheren Pflanzen gleich und kann daher als konserviert angesehen werden.

Mit den nunmehr vorliegenden Daten über plastidäre mRNA-Halbwertszeiten aus Spinat, Gerste, Tabak und *Arabidopsis* stehen *in vivo* gemessene Werte für vier Vertreter der Angiospermen zur Verfügung. Innerhalb der systematischen Gruppe der Angiospermen sind diese vier Pflanzenarten eher entfernt miteinander verwandt (Donoghue & Doyle, 1989; Soltis *et al.*, 1998; Soltis *et al.*, 1999). Die Ähnlichkeit der gemessenen mRNA-Halbwertszeiten für das jeweilige Gen bzw. Operon bei den untersuchten Pflanzenarten läßt daher darauf schließen, daß der mRNA-Metabolismus in Chloroplasten bei allen Vertretern der Angiospermen hinsichtlich der mRNA-Stabilitäten konserviert ist. Darüber hinaus liegen nun auch Daten über mRNA-Halbwertszeiten aus zwei Pflanzenarten vor, die sich bereits als Untersuchungsobjekte für die genetische und molekulare Charakterisierung von plastidärer Genexpression etabliert haben. Hierbei liegt die Bedeutung von *Arabidopsis* eher auf der Seite (molekular-)genetischer Methoden während Tabak durch die Entwicklung der Technik der effizienten Plastidentransformation (Svab & Maliga, 1990; Staub & Maliga, 1994) eine besondere Bedeutung bei der Erforschung der plastidären Genexpression und insbesondere des mRNA-Metabolismus erlangt hat.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Messungen von mRNA-Halbwertszeiten bei im Gewächshaus kultivierten Tabakpflanzen konnten die Ergebnisse früherer Messungen bestätigen, bei denen die Stabilität von plastidären mRNA-Spezies in Mesophyllprotoplasten und *in vitro* kultivierten Pflanzen untersucht wurde (Horlitz, 1995 / Tab. 5.2). Betrachtet man den Habi-

	<i>psbA</i>	<i>rbcL</i>	<i>psaA/B-rps14</i>
Gew.-haus-Kultur (reife Blätter) ¹	$\gg 50$ h	$25,2 \pm 5,6$ h	$4,5 \pm 0,7$ h
<i>in vitro</i> -Kultur (reife Blätter) ² [kein Zerfall über 12 h]		≈ 20 h	$\approx 3,3$ h
Mesophyllprotoplasten ²	≈ 50 h	≈ 22 h	≈ 5 h

Tabelle 5.2: **Halbwertszeiten von mRNAs reifer Chloroplasten in Tabak.** ¹Diese Arbeit. ²Horlitz, 1995

tus von *in vitro* kultivierten Tabakpflanzen, so sind diese im Vergleich zu Gewächshauspflanzen im Wuchs stark reduziert und besitzen etwa 1 cm lange expandierte Blätter; diese erreichen jedoch bei im Gewächshaus oder im Freiland kultivierten Pflanzen eine Länge von 15 – 20 cm. Da die gemessenen Halbwertszeiten plastidärer mRNAs übereinstimmten, kann davon ausge-

gangen werden, daß die mRNA-Stabilität weniger vom (Differenzierungs-)Zustand des Gewebes als vielmehr vom Differenzierungs- bzw. Reifegrad des Chloroplasten selbst abhängt.

5.2 Mechanismus des Abbaus der *psbA*-mRNA

Erkenntnisse über die Mechanismen der mRNA-Degradation und insbesondere die Identifizierung von *cis*-regulatorisch wirkenden Elementen ist eine entscheidende Voraussetzung für das Verständnis der Regulation der mRNA-Stabilität. In Chloroplasten von *Chlamydomonas* und höheren Pflanzen konnten in den letzten Jahren eine Reihe von Beispielen für das Wirken von *cis*-regulatorischen Elementen identifiziert werden. Neben der 3'-untranslatierten Region plastidärer mRNAs, deren Rolle bei der Prozessierung und dem Schutz der reifen mRNA vor 3'→5'-exonukleolytischem Abbau heute gut belegt ist (Übersicht: Drager & Stern, 1998)¹, konnten – im wesentlichen bei *Chlamydomonas* – auch Elemente innerhalb der 5'-untranslatierten Region plastidärer mRNAs identifiziert werden, die *cis*-Determinanten der mRNA-Stabilität enthalten. Ein gut charakterisiertes Beispiel ist die nukleäre Mutante *nac2-26*, die zur Instabilität der *psbD*-mRNA des Chloroplasten führt. Es konnte gezeigt werden, daß die Destabilisierung über die Bindung eines spezifischen Proteins an die 5'-untranslatierte Region der *psbD*-mRNA vermittelt wird (Nickelsen *et al.*, 1994). Für die *petD*-mRNA in *Chlamydomonas* konnte gezeigt werden, daß eine Stabilisierung des Transkriptes über die 5'-untranslatierte Region als Folge von funktionierender Translation erreicht wird (Sakamoto *et al.*, 1994). Dabei bindet ein kernkodierter Proteinfaktor innerhalb der 5'-untranslatierten Region und kann damit als Schutz gegen eine 5'→3'-Exonuklease dienen (Drager *et al.*, 1998). In Chloroplasten höherer Pflanzen konnten bisher nur indirekte Hinweise auf eine Bedeutung der 5'-untranslatierten Region der mRNAs bei der Regulation der RNA-Stabilität gewonnen werden. Für Mais-Chloroplasten konnte gezeigt werden, daß die *rbcL*-mRNA in Mutanten, die eine geringe Polysomenassoziation der mRNAs aufweisen, in ihrer Konzentration vierfach reduziert ist (Barkan, 1993). Dies ist ein Hinweis auf die Bedeutung der Translation für die Aufrechterhaltung der mRNA-Stabilität. Ebenfalls für die *rbcL*-mRNA konnte in Tabak anhand der Analyse von *rbcL*5'UTR-*uidA*-Fusionskonstrukten demonstriert werden, daß eine Stabilisierung der chimären mRNA bei Dunkelheit über die 5'-untranslatierte Region vermittelt wird (Shiina *et al.*, 1998). Im Fall der 5'-untranslatierten Region der *psbA*-mRNA zeigte sich, daß diese nicht nur die Stabilität, sondern auch die Effizienz und Licht-Induzierbarkeit der Translation auf eine Reporter-mRNA übertragen kann (Eibl *et al.*, 1999).

Frühere Arbeiten über den Mechanismus des Abbaus der *psbA*-mRNA in höheren Pflanzen (Spinat) konnten bereits einige Teilprozesse der mRNA-Degradation offenlegen. Die *psbA*-mRNA wird zunächst durch endonukleolytische Schnitte in definierte Fragmente zerlegt.

¹Zur Bedeutung von Strukturelementen innerhalb der 3'-untranslatierten Region plastidärer mRNAs: Siehe Abschnitt 5.3

Diese werden dann an ihren freien 3'-Enden polyadenyliert/polypurinyliert, um dann schnell exonukleolytisch in 3'→5'-Richtung abgebaut zu werden (Klauff, 1995; Lisitsky *et al.*, 1996, Lisitsky *et al.*, 1997). Dabei zeigte sich bereits, daß die den Abbau einleitenden endonukleolytischen Schnitte in 5'→3'-Richtung über die mRNA laufen. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß der Abbau der *psbA*-mRNA im intakten Chloroplasten durch einen oder mehrere frühe endonukleolytische Schnitte innerhalb der 5'-untranslatierten Region eingeleitet wird. Der sich anschließende Abbau des verbleibenden distalen Restes der mRNA, welcher die gesamte kodierende Region enthält, erfolgt durch weitere endonukleolytische Schnitte, die ohne klar erkennbare Reihenfolge die kodierenden Region der mRNA in definierte Fragmente spalten. Dieses Szenario des Abbaus der *psbA*-mRNA ist in **Abb. 5.1** dargestellt: Die

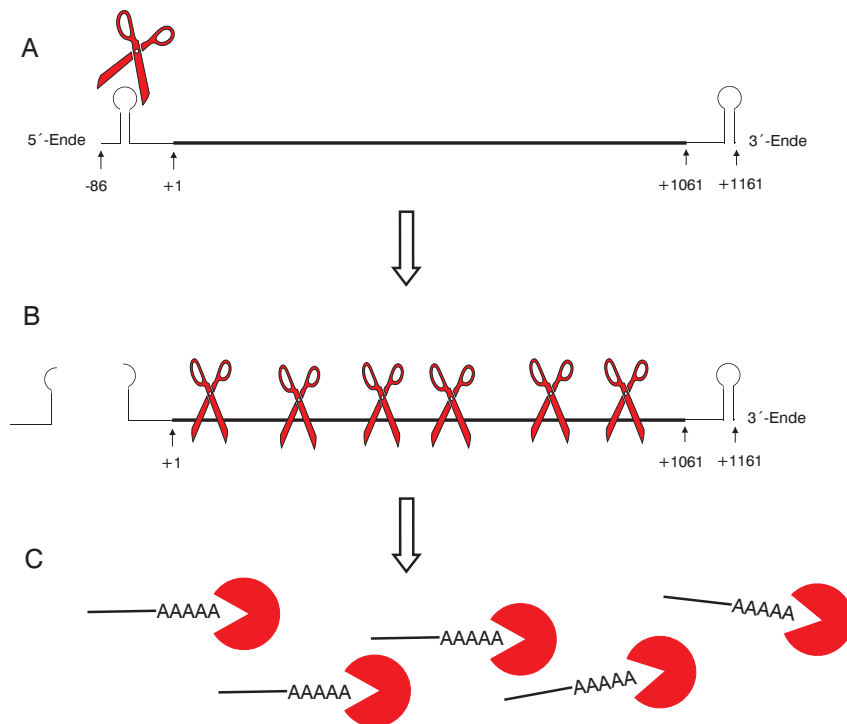


Abbildung 5.1: **Abbaumechanismus der der *psbA*-mRNA.** Die ersten endonukleolytischen Schnitte finden innerhalb der 5'-untranslatierten Region statt (**A**), dadurch wird die kodierende Region für weitere endonukleolytische Spaltungen zugänglich (**B**), durch die die mRNA ohne erkennbare Reihenfolge in definierte Fragmente zerlegt wird. Diese Fragmente werden polyadenyliert (Lisitsky *et al.*, 1996) und damit für den schnellen Abbau durch 3'→5'-Exonukleasen markiert (**C**).

frühen Schnitte innerhalb der 5'-untranslatierten Region sind als der entscheidende Schritt des mRNA-Abbaus anzusehen: Die mRNA wird erst durch diese endonukleolytischen Spaltungen zum effizienten Substrat für den weiteren Abbau durch Endonukleasen. Damit konnte in dieser Arbeit erstmals auf biochemischem Wege ein starker Hinweis auf die Bedeutung der 5'-untranslatierten Region für die Stabilität einer plastidären mRNA in höheren Pflanzen

erbracht werden. Darüber hinaus zeigte sich, daß lysierte Chloroplasten – trotz erhöhter Zerfallsgeschwindigkeit – ein bezogen auf die Fragmentmuster treues Abbild der Situation im intakten Organell darstellen. Die Reihenfolge der den Abbau initiiierenden Schnitte stimmt ebenfalls weitgehend zwischen Chloroplastenlysat und intakten Chloroplasten überein, wobei allerdings im Lysat die Degradation der *psbA*-mRNA nicht nur durch Schnitte innerhalb der 5′-untranslatierten Region, sondern auch durch eine weitere Spaltung in der kodierenden Region etwa bei Position +80/+90 eingeleitet wird. Letzteres läßt sich damit erklären, daß in lysierten Chloroplasten keine Translation mehr initiiert wird, sodaß hier keine polysomenassoziierten mRNAs vorliegen; – die Abwesenheit von Ribosomen kann eine erhöhte Suszeptibilität für Endonukleasen zur Folge haben, wie Arbeiten an Mais ergeben haben (Barkan, 1993).

5.3 Die Bedeutung konservierter mRNA-Strukturen

Die Berechnungen von thermodynamisch optimalen Faltungen der *psbA*-mRNAs (verfügbare Vollängensequenzen von Angiospermen) ergaben für mRNAs einzelner Spezies einen hohen Grad an Strukturbildung, insbesondere im Bereich der proteinkodierenden Region. Angesichts eines hohen Grades an Sequenzhomologie (90 – 95 %) unter den untersuchten *psbA*-Sequenzen ist es bemerkenswert, daß nur einige lokale Strukturelemente innerhalb der Angiospermen konserviert sind. Bei Berücksichtigung aller Basenpaarungen mit einer Wahrscheinlichkeit von mehr als 50 % ergeben sich für die *psbA*-mRNA 15 lokale Haarnadelstrukturen, die über das gesamte Molekül verteilt sind. Eine Häufung ist allerdings im 3′-Bereich der mRNA zu beobachten.

Die thermodynamisch optimalen Strukturen der einzelnen untersuchten *rbcL*-mRNA-Sequenzen ergaben im Vergleich zu den optimalen *psbA*-mRNA-Faltungen einen deutlich geringeren Grad an Strukturbildung. Bei der Betrachtung der konservierten Strukturelemente der *rbcL*-mRNA ergeben sich zwar ebenfalls eine Reihe lokaler Haarnadelstrukturen (insgesamt 16), diese umfassen aber weniger Basenpaarungen als die konservierten Strukturen der *psbA*-mRNA und erweisen sich bei genauerer Betrachtung der zugrundeliegenden Basenpaarwahrscheinlichkeiten als überwiegend schwach konserviert. Lediglich die 3′-terminale Haarnadelstruktur, die in der 3′-untranslatierten Region liegt (Strukturelement XVI) ist mit Basenpaarwahrscheinlichkeiten von 80 – 90 % stark konserviert. Generell zeigte sich auch für die *rbcL*-mRNA, daß die Consensus-Struktur deutlich weniger Strukturelemente enthält als die thermodynamisch optimalen Faltungen einzelner *rbcL*-mRNAs.

Der Befund, daß innerhalb eines Satzes an homologen mRNAs trotz strukturreicher Einzelsequenzen die Consensus-Struktur nur wenige konservierte Struktur motive aufweist, ist bereits aus anderen Systemen bekannt: So enthält die mRNA des Prion-Proteins der Säugetiere nur wenige kleine konservierte Haarnadelstrukturen innerhalb der kodierenden Region, obwohl die einzelnen betrachteten mRNAs sehr reich an Sekundärstruktur sind und die Sequenzho-

mologie bei 86 % liegt (Lück *et al.*, 1996). Daraus läßt sich in diesem Fall wie auch bei den hier betrachteten Chloroplasten-mRNAs schließen, daß ein beträchtlicher Teil der Strukturen, die eine Vorhersage der thermodynamisch optimalen Faltung einer einzelnen mRNA liefert, keine biologische Signifikanz besitzt.

Die Consensus-Struktur der *psbA*-mRNA zeigt neben einer ebenfalls hochkonservierten Haarnadelstruktur in der 3'-untranslatierten Region (Strukturelement XV) weitere stark konservierte Strukturelemente (III, IV, VI und XI). Das Strukturelement III ist besonders auffällig, da bei Spinat die Position des Loop-Bereiches dieser Haarnadelstruktur genau mit der Position der in lysierten Chloroplasten identifizierten prominenten Schnittstelle (Position +86/+88; Klaff, 1995 und diese Arbeit) der *psbA*-mRNA zusammenfällt. Dieses Strukturelement ist auch in der einzeln gerechneten thermodynamisch optimalen Struktur der *psbA*-mRNA als separates Element enthalten; mit Basenpaarwahrscheinlichkeiten von 99 % gehört diese kurze Haarnadelstruktur zu den stabilsten der gesamten *psbA*-mRNA (Spinat). Die in mRNA-Zerfallsexperimenten beobachtete hohe Spaltungseffizienz an der Position +86/+88 der *psbA*-mRNA in Spinat deutet darauf hin, daß die beiden Schnittstellen durch ihre exponierte Anordnung am Ende einer Haarnadelstruktur besonders gut von Endonukleasen erkannt werden.

Eine Haarnadelstruktur innerhalb der 3'-untranslatierten Region plastidärer mRNAs gilt seit langem als ein biologisch bedeutsames Element, daß zum einen als Prozessierungssignal (z. B. Stern & Gruissem, 1989) fungiert, zum andern als genereller Schutz der mRNA gegenüber dem Angriff von 3'→5'-Exonukleasen. Die hier durchgeführten Vorhersagen konservierter Strukturen der *psbA*- und *rbcL*-mRNA konnten bestätigen, daß diese Strukturelemente im Fall beider mRNAs zu den am stärksten konservierten Strukturen gehören. Hingegen erweisen sich die Haarnadelstrukturen innerhalb der 5'-untranslatierten Region als deutlich weniger konserviert. Dies muß nicht zwangsläufig auf eine geringere Bedeutung bei der Regulation der mRNA-Stabilität oder Translation hindeuten. Vielmehr bedeutet eine weniger konservierte Struktur bzw. eine Struktur mit geringer Faltungsenergie ΔG auch das Vorliegen einer größeren strukturellen Flexibilität, wie sie für dynamische regulatorische Prozesse sinnvoll ist. Dieses konnte auch experimentell für die Struktur der 5'-untranslatierten Region der *psbA*-mRNA in Spinat gezeigt werden: Eine Strukturänderung führt hier zum Verlust der Fähigkeit der RNA, Proteine eines Chloroplastenextraktes zu binden (Klaff *et al.*, 1997). In *Chlamydomonas* konnte anhand der *rps7*-mRNA demonstriert werden, daß Änderungen der Sekundärstruktur der 5'-untranslatierten Region mit der Translationseffizienz eines nachgeschalteten Reportergens korrelieren (Fargo *et al.*, 1999).

Die generelle Bedeutung der mRNA-Struktur für den Abbau derselben ergibt sich aus den Ergebnissen der Zerfallsexperimente mit teilweise doppelsträngigen *psbA*-Transkripten in Chloroplastenlysaten. Doppelsträngige RNA ist kein nennenswertes Substrat für den mRNA-Abbau *in vitro*, dies ist bemerkenswert, da im Chloroplastenlysate die RNA-Degradationsaktivität deutlich höher ist als im intakten Organell. Es muß also aufgrund der hier vorgelegten Da-

ten davon ausgegangen werden, daß die auf der *psbA*-mRNA identifizierten Schnittstellen einzelsträngig vorliegen müssen, um für den Angriff von Exonukleasen zugänglich zu sein.

5.4 Magnesium-induzierte genspezifische mRNA-Stabilisierung

Zweiwertige Kationen und insbesondere Magnesiumionen stellen eine zentrale Komponente der strukturellen und biologischen Aktivität von RNA dar. Dies wurde an einer Reihe von Modellmolekülen intensiv untersucht, wie z. B. Gruppe-I-Introns bei Tetrahymena, dem Hammerkopf-Ribozym, dem Hepatitis- δ -Ribozym und der M1-RNA der RNase P (Übersicht: Lilley, 1999; Misra & Draper, 1998; Scott & Klug, 1996). In dieser Arbeit konnte darüber hinaus gezeigt werden, daß Magnesiumionen auch die physikalischen Halbwertszeiten von mRNAs in genspezifischer Weise beeinflussen können. In Chloroplasten von Spinat werden RNAs durch Magnesium spezifisch stabilisiert. Jede der untersuchten RNA-Spezies (tRNA_{His}, 16S-rRNA, *psbA*-mRNA, *rbcL*-mRNA) benötigt eine bestimmte Magnesiumkonzentration, um eine physikalisch stabile Form anzunehmen, ebenso sind die Stabilisierungsprofile verschieden und typisch für jede untersuchte RNA. tRNA - hier am Beispiel der tRNA_{His} untersucht – wird bereits bei sehr niedrigen Magnesiumkonzentrationen im mikromolaren Bereich stabilisiert, was sich in einer steil ansteigenden Kurve im Stabilisierungsprofil zeigt. Diese niedrige Magnesiumkonzentration dürfte der bekannten hohen Affinität von tRNA zu Mg²⁺-Ionen entsprechen. Für den Anticodon-Loop der tRNA_{Phe} aus Hefe konnte eine Bindekonstante zu Mg²⁺ von $2 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ (bei pH 7,1 / 0,1 M Na⁺-Konzentration) bestimmt werden (Labuda & Pörschke, 1982; Bujalowski *et al.*, 1986). tRNAs besitzen zwischen drei und sechs Bindestellen für Magnesiumionen, die voneinander unabhängig sind. – Dies wird ebenfalls vom Stabilisierungsprofil wiedergegeben, das keine kooperative Wirkung von Mg²⁺ zeigt.

Die ribosomale 16S RNA wird bei einer freien Mg²⁺-Konzentration von etwa 2 mM stabilisiert. Es ist bisher nur wenig über die Wechselwirkungen von Magnesiumionen mit der kompletten 16S-rRNA bekannt. UV-Quervernetzungsstudien an der 16S-rRNA von Ribosomen aus *E. coli* bei steigenden Mg²⁺-Konzentrationen (1 – 20 mM) ergaben, daß Effizienz von 12 der 14 gefundenen Vernetzungspositionen kaum beeinflußt wurde. (Noah & Wollenzien, 1998). Zwei weitere magnesiuminduzierte Vernetzungen liegen im Bereich der Dekodierungsregion der 30S-Untereinheit des Ribosoms und sind nur bei Mg²⁺-konzentrationen oberhalb von 3 mM nachweisbar, was darauf hindeutet, daß in *E. coli*-Ribosomen isolierte Regionen mit größerer struktureller Flexibilität und Ansprechbarkeit für Magnesium vorliegen. Die Ribosomen von Chloroplasten ähneln denen von *E. coli* und daher kann das hier bestimmte Mg²⁺-abhängige Stabilisierungsprofil der 16S-rRNA durch Interaktion der flexiblen Region mit Mg²⁺-Ionen erklärt werden.

Bisher wurde noch kein direkter Effekt ein- oder zweiwertiger Kationen auf mRNA-Halbwertszeiten beschrieben. In dieser Arbeit konnte nun erstmals gezeigt werden, daß verschiedenen plastidäre mRNAs auf Magnesium hinsichtlich ihrer Stabilität unterschiedlich reagieren. Die *psbA*-mRNA, deren Stabilität während der Chloroplastenreifung reguliert wird, zeigt ein sigmoidales Mg^{2+} -abhängiges Stabilisierungsprofil; die nur schwach stabilitätsregulierte *rbcL*-mRNA zeigt ein Stabilisierungsprofil, daß eher dem der 16S-rRNA ähnelt, wenn auch mit einer geringeren Steigung. Die Bestimmung der Kooperativität anhand der Hillkoeffizienten ergab, daß 7 (± 3) Mg^{2+} -Ionen kooperativ zusammenwirken müssen, um der *psbA*-mRNA Stabilität zu verleihen, während die Stabilisierung der *rbcL*-mRNA auf das unabhängige Wirken von Mg^{2+} -Ionen zurückzuführen ist. Diese starke Kooperativität des Magnesium-Effektes auf die Stabilität der *psbA*-mRNA erlaubt eine empfindliche Schalter-ähnliche Reaktion der mRNA-Stabilität auf physiologische Änderungen der Mg^{2+} -Konzentration innerhalb des Chloroplasten-Stromas, die deutlich weniger als eine Zehnerpotenz ausmachen. Es ist nicht anzunehmen, daß Calciumionen eine ähnliche Rolle für die Regulation der mRNA-Stabilität spielen können, da die Konzentrationen von freien Ca^{2+} -Ionen im Stroma-Kompartiment von Chloroplasten *in vivo* unterhalb von 150 nM liegen (Johnson *et al.*, 1995). Die bekannten Bindekonstanten von Ca^{2+} an RNA liegen im millimolaren Bereich (Menger *et al.*, 1996) und damit vier Größenordnungen höher als die Konzentration des freien Ca^{2+} in Chloroplasten. Eine direkte Wechselwirkung von Calciumionen mit plastidären RNAs ist daher sehr unwahrscheinlich.

Die Beobachtung, daß das Muster und die Abundanz von Degradationsintermediaten der *psbA*-mRNA von der Magnesiumkonzentration in der Weise beeinflusst wird, daß Magnesiumionen eine hemmende Wirkung auf die Spaltungsaktivität ausübt, weist darauf hin, daß Mg^{2+} die Zugänglichkeit der Schnittstellen für Nukleasen verringert. Zur Erklärung dieser Magnesiumwirkung sind mehrere Szenarien denkbar:

- Die Wechselwirkung von Magnesiumionen ist eine direkte Bindung an die RNA, die eine Konformationsänderung der RNA bewirkt. Die magnesiuminduzierte RNA-Konformation ist stärker resistent gegenüber dem Angriff von Endonukleasen, die ihrerseits – wie in dieser Arbeit indirekt gezeigt – eine hohe Spezifität für einzelsträngig vorliegende RNA aufweisen. Eine Mg^{2+} -abhängige Faltung der 5'-untranslatierte Region der *psbA*-mRNA könnte dazu führen, daß die den Abbau einleitenden Schnittstellen basengepaart vorliegen und somit geschützt sind, was im Endeffekt zu einer stabileren *psbA*-mRNA führt.
- Strukturelle Änderungen der RNA in Abhängigkeit von Magnesium kann die Fähigkeit der RNA zur Bindung von Proteinen beeinflussen. Die Bedeutung der RNA-Struktur für die Proteinbindung konnte bereits früher für die 5'-untranslatierte Region der *psbA*-mRNA gezeigt werden. In diesem Fall ließen sich Proteinbindungs-aktive und -inaktive Konformere der RNA klar voneinander abgrenzen (Klafl *et al.*, 1997).

- Ein weiteres Modell geht davon aus, daß Magnesiumionen spezifisch mit RNA-bindenden Proteine interagieren. Eine Mg^{2+} -abhängige Konformationsänderung eines oder mehrerer Proteine könnte deren Bindung an die RNA und damit die RNA-Stabilität beeinflussen. Diese Interpretation der Ergebnisse macht aber die Existenz genspezifischer mRNA-bindender Proteine zur Voraussetzung. Solche sind – im Gegensatz zu *Chlamydomonas* – bei höheren Pflanzen bisher nicht beschrieben worden.

Es erscheint aufgrund der vorliegenden Daten dieser Arbeit und auch früherer Untersuchungen als naheliegend, den genspezifischen Effekt von Magnesium auf die RNA-Stabilität in Chloroplasten auf eine direkte Wechselwirkung von Mg^{2+} -Ionen mit der RNA zurückzuführen, wobei mRNA-bindende Proteine durchaus eine vermittelnde Rolle bei der Regulation der RNA-Stabilität spielen können. Durch die Bindung von Magnesiumionen an RNA werden neben Sekundärstrukturen auch tertiäre Faltungen induziert, zur Ausbildung letzterer ist die Anwesenheit von zweiwertigen Kationen eine Voraussetzung. In *Chlamydomonas* konnte die Bedeutung von mRNA-Strukturen für die Translation (Fargo *et al.*, 1999; Mayfield *et al.*, 1994) und auch die mRNA-Stabilität (Higgs *et al.*, 1999) gezeigt werden; es bleibt aber noch zu untersuchen, inwieweit Änderungen der Strukturen einer mRNA ein Bestandteil der Genexpressionsmaschinerie sind.

Nach klassischer Auffassung wird davon ausgegangen, daß es sich bei *trans*-regulatorischen Faktoren der Genexpression im Allgemeinen und der mRNA-Stabilität im Besonderen um Proteine handelt. Basierend auf den Befunden dieser Arbeit läßt sich eine solche Rolle auch für Magnesiumionen diskutieren. Steigende Magnesiumkonzentrationen führen zur Stabilisierung plastidärer mRNAs in einer genspezifischen Weise. Die Bestimmung der freien Magnesiumkonzentration im Rahmen dieser Arbeit ergab eine Konzentration von 3 – 4 mM Mg^{2+} im Stroma junger Chloroplasten im Licht und 8 – 10 mM Mg^{2+} im Stroma reifer belichteter Chloroplasten. Der Vergleich dieser Magnesiumkonzentrationen mit den RNA-Stabilisierungsprofilen zeigt, daß die *psbA*-mRNA in Gegenwart einer für junge Chloroplasten typischen Magnesiumkonzentration instabil ist, während ihre Stabilität *in vitro* unter Magnesiumbedingungen reifer Chloroplasten vierfach erhöht ist. Das Verhältnis der Mengen intakter RNA nach drei Stunden Inkubation in Extrakten, die hinsichtlich der Mg^{2+} -Konzentration junge und reife Chloroplasten repräsentieren, ist 1,0 für tRNA_{His}, 1,4 für 16S-rRNA und 1,5 für die *rbcL*-mRNA. Diese Daten passen exakt zu den Änderungen der Halbwertszeiten von *psbA*- und *rbcL*-mRNA *in vivo*, die im homologen System (Spinat) bereits früher bestimmt wurden (Klafl & Gruissem, 1991). In jener Arbeit wurde im Verlauf der Entwicklung von jungen zu reifen Blättern (d. h. während der Chloroplastenreifung) für die *psbA*-mRNA eine Zunahme der Halbwertszeit um den Faktor 2 bis 3 relativ zur 16S-rRNA beobachtet, während die gegen 16S-rRNA normalisierte Halbwertszeit der *rbcL*-mRNA nur unmerklich um den Faktor 1,1 zunahm. Vergleicht man nun die Magnesiumkonzentrationen junger und reifer Chloroplasten und ihre Wirkung auf die mRNA-Stabilisierung relativ zur 16S-rRNA,

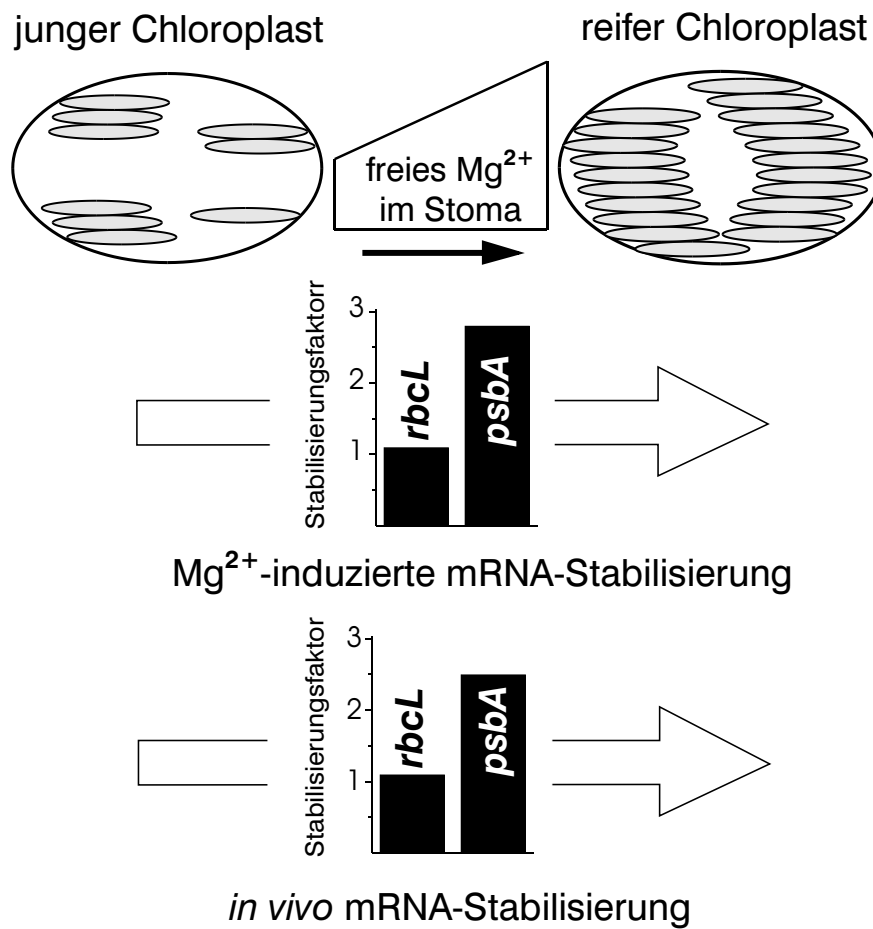


Abbildung 5.2: **Magnesium-induzierte genspezifische mRNA-Stabilisierung.** Die Reifung des Chloroplasten und die begleitenden Änderungen der freien Mg-Konzentration im Stroma sind schematisch im oberen Teil dargestellt. Darunter ist die magnesiuminduzierte mRNA-Stabilisierung gezeigt, wobei der Stabilisierungsfaktor auf den Vergleich von mRNA-Stabilitäten bei Mg^{2+} -Konzentrationen junger und reifer Chloroplasten zurückgeht. Der untere Teil zeigt die entwicklungsabhängige mRNA-Stabilisierung *in vivo* (nach Klaff & Gruissem, 1991)

so ergibt sich für die *psbA*-mRNA eine Stabilisierung um den Faktor 2,8 und für *rbcL*-mRNA um den Faktor 1,1. Dieser Zusammenhang ist in **Abb. 5.2** modellhaft dargestellt. Die *in vitro* beobachtete Stabilisierung von mRNAs durch Magnesium entspricht quantitativ genau der *in vivo* gemessenen Stabilisierung von mRNAs während der Blattentwicklung. Daher läßt sich feststellen, daß die Änderungen der Magnesiumkonzentration während der Reifung des Chloroplasten hinreichend sind, um genspezifische Änderungen in den mRNA-Halbwertszeiten hervorzurufen.

Der in dieser Arbeit beschriebene „Magnesium-Effekt“, d. h. die magnesiuminduzierte genspezifische Stabilisierung von (m)RNAs kann als Grundlage eines neuen Konzeptes der entwicklungsabhängigen Regulation der differentiellen mRNA-Stabilität angesehen werden. Die während der Chloroplastenreifung ansteigende Konzentration an freiem Mg^{2+} im Stoma kann als eine Folge der zunehmenden physiologischen Aktivität des Chloroplasten angesehen werden. Die steigende Magnesiumkonzentration führt nun genspezifisch zur Stabilisierung von mRNAs, wobei die Eigenschaften der einzelnen mRNA-Spezies ihre Antwort auf die steigende Magnesiumkonzentration bestimmen. Im einfachsten Fall erfolgt die stabilisierende Wirkung von Magnesium durch direkte Bindung an die mRNA an bestimmten Mg^{2+} -Bindestellen, deren Bindeeigenschaften durch Sequenz und Struktur der mRNA bestimmt werden.

5.5 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die genspezifische stabilisierende Wirkung von Magnesiumionen auf RNAs in Chloroplasten höherer Pflanzen gezeigt werden; darüber hinaus konnten Untersuchungen der magnesiumabhängigen Änderungen des Degradationsmusters der *psbA*-mRNA erste Informationen über den Mechanismus der Magnesiumwirkung liefern. Auf der Grundlage dieser Arbeit sollte nun der Mechanismus der RNA-stabilisierenden Wirkung von Magnesium weiter geklärt werden, dabei steht der Vergleich der mRNAs der Gene *psbA* und *rbcL*, die sich hinsichtlich ihrer Reaktion auf steigende Magnesiumkonzentrationen unterscheiden, im Vordergrund – die Arbeiten sollten aber zur Klärung genspezifischer Effekte auf weitere mRNAs des Chloroplasten ausgedehnt werden. Zunächst ist es erforderlich, die Bindestellen von Mg^{2+} -ionen auf der *psbA*-mRNA zu kartieren. Dies läßt sich durch Mg^{2+} - und Pb^{2+} -vermittelte Spaltung von *in vitro*-Transkripten erreichen, da die Spaltungsstellen in der Nähe spezifischer Metallionen-Bindestellen lokalisiert sind. Nach der Kartierung von Mg^{2+} -Bindestellen auf der mRNA wäre es notwendig, Magnesium/RNA-Bindungsprofile zu bestimmen und zu untersuchen, ob und in welchem Maße die in dieser Arbeit bestimmten „Wirkungskurven“ der Mg^{2+} -abhängigen RNA-Stabilisierung durch Bindungskurven repräsentiert werden.

Im Zusammenhang mit der Aufklärung des Mechanismus der Magnesiumwirkung sollte auch der Abbaumechanismus der *psbA*-mRNA näher untersucht werden. Eine besondere Bedeu-

tung hat hierbei die Identifizierung und Charakterisierung *cis*-regulatorischer Elemente im 5'-Bereich der *psbA*-mRNA. Da es nunmehr als gesichert anzusehen ist, daß der Abbau der *psbA*-mRNA innerhalb der 5'-untranslatierten Region initiiert wird, müßte nun geklärt werden, ob diese Region ein *cis*-regulatorisches Element strenger Definition darstellt, d. h., ob mittels der *psbA*-5'-untranslatierten Region Stabilitätseigenschaften auf andere mRNAs übertragen werden können. Zu diesem Zweck müßten chimäre mRNA-Konstrukte (Austausch von 5'- und 3'-Elementen zwischen der *psbA*- und *rbcL*-mRNA) hergestellt werden, die dann zunächst *in vitro*, dann aber auch in transplastomischen Pflanzen *in vivo* untersucht werden könnten. In diesem Zusammenhang könnte auch geklärt werden, ob ein bestimmtes Fragment der *psbA*-mRNA die hochkooperative Stabilisierbarkeit durch Magnesium auf die *rbcL*-mRNA übertragen kann.

Gelingt die Identifizierung eines sicheren „Kandidaten“ für ein *cis*-regulatorisch wirkendes Element auf der *psbA*-mRNA, so könnte ein solches RNA-Fragment einer detaillierteren Strukturanalyse unterzogen werden, wobei durch Mg^{2+} induzierte Tertiärstrukturen nachgewiesen werden könnten. Je nach Größe des zu untersuchenden RNA-Fragmentes könnte eine Strukturanalyse bis zur atomaren Auflösung mit Hilfe der NMR-Spektroskopie oder der Röntgenstrukturanalyse durchgeführt werden.

Kapitel 6

Zusammenfassung

In Chloroplasten höherer Pflanzen wird die Akkumulation von mRNAs während der Blattentwicklung durch genspezifische mRNA-Stabilisierung erreicht. Die vorliegende Arbeit hatte die Untersuchung der Mechanismen zum Inhalt, nach denen der Abbau von mRNA-Molekülen in Chloroplasten abläuft, sowie die Art und Weise, wie der mRNA-Abbau genspezifisch reguliert wird. Zu diesem Zweck wurde zunächst ein Überblick über den mRNA-Metabolismus in Chloroplasten anhand der Bestimmung von *in vivo*-Halbwertszeiten plastidärer mRNAs gewonnen. Die Bedeutung von mRNA-Sekundärstrukturen wurde durch die Rechner-gestützte Vorhersage konservierter Strukturelemente untersucht. Zur näheren Charakterisierung von Mechanismus und Kontrolle des mRNA-Abbaus wurde ein *in vitro*-RNA-Degradationssystem eingesetzt, daß die Identifizierung *cis*-regulatorischer Elemente und *trans*-regulatorischer Faktoren erlaubte.

In Tabak (*Nicotiana tabacum*) und *Arabidopsis thaliana* wurden die Halbwertszeiten $t_{\frac{1}{2}}$ der mRNAs der Gene bzw. Operons *psbA*, *rbcL*, *psaA/B-rps14* und *atpB/E* bestimmt. Diese liegen im Bereich von 5 bis >50 Stunden und entsprechen den Werten, die bereits für mRNA-Stabilitäten in Chloroplasten von Spinat und Gerste bekannt waren, so daß darauf geschlossen werden kann, daß die grundlegenden Charakteristika des mRNA-Metabolismus bei allen Angiospermen gleich sind. Die theoretische Vorhersage konservierter Sekundärstrukturen innerhalb der *psbA*- und *rbcL*-mRNAs der Angiospermen mit Hilfe des Programms CONSTRUCT ergab, daß beide mRNAs eine Reihe konservierter Haarnadelstrukturen enthalten, wobei sich eine hochkonservierte Struktur in der 3'-untranslatierten Region, und eine weniger stark konservierte Struktur in der 5'-untranslatierten Region befindet. Die *psbA*-mRNA besitzt generell deutlich mehr konservierte Struktur als die *rbcL*-mRNA.

Der Mechanismus des spezifischen Abbaus der *psbA*-mRNA wurde in lysierten Chloroplasten sowie *in organello* untersucht: Hochauflösende Northern-Analysen ergaben, daß der Abbau der *psbA*-mRNA durch spezifische endonukleolytische Schnitte in der 5'-untranslatierten Region eingeleitet wird, als deren Folge der verbleibende distale Rest der mRNA empfindlich für

weitere Schnitte innerhalb der kodierenden Region wird. Ferner konnte *in vitro* demonstriert werden, daß doppelsträngige RNA kein Substrat für plastidäre Nukleasen darstellt.

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, daß Magnesiumionen *in vitro* genspezifisch die Halbwertszeiten plastidärer RNAs beeinflussen: In lysierten Chloroplasten benötigt die tRNA_{His} mindestens ca. 3 μ M, die 16S-rRNA mindestens ca. 2 mM und die *rbcL*-mRNA mindestens ca. 3 mM Mg²⁺, um physikalisch stabil zu werden. Die *psbA*-mRNA, deren Stabilität als einzige der betrachteten RNAs sich während der Blattentwicklung deutlich erhöht, wird bei einer Mg²⁺-Konzentration von ca. 6 mM in hochkooperativer Weise stabilisiert. Da die Konzentration an freien Mg²⁺-Ionen im Stromakompartiment von Chloroplasten während der Organellentwicklung von 3 – 4 mM auf 8 – 10 mM ansteigt, muß Mg²⁺ als ein Kandidat für einen genspezifisch wirkenden RNA-Stabilisierungsfaktor angesehen werden. Die Analyse von Degradationsfragmenten der *psbA*-mRNA in Abhängigkeit von der Mg²⁺-Konzentration *in vitro* konnten Hinweise darauf liefern, daß Magnesium die mRNA durch Blockieren definierter endonukleolytischer Schnittstellen im 5'-Bereich der mRNA stabilisiert.

Kapitel 7

Dokumentationen

- Oligonukleotid-Sonden für Northern-Analysen
- Primer zur PCR-Herstellung von Transkriptionsmatrizen
- Dotplot-Darstellungen der Strukturelemente innerhalb der untranslatierten Regionen der *psbA*- und *rbcL*-mRNA
- Alignment der *psbA*- und *rbcL*-Sequenzen inklusive konservierter Sekundärstrukturen

7.1 DNA-Oligonukleotide

7.1.1 Oligonukleotid-Sonden für Northern-Analysen

Name	Sequenz (5'→3')	Zielsequenz
psbA-86	ATTCG CTAGA AATAG AAATT GAAAG ATTGT TATT	<i>psbA</i> -mRNA ¹ , -86/-51
psbA-46	TGGTT TATTT AATTT AATCA TCAGG G	<i>psbA</i> -mRNA ¹ , -46/-21
psbA+13	GGCTT TCGCT TTCGC GTCTC	<i>psbA</i> -mRNA ^{1,2,3} , +18/+37
psbA+1057	ACTAG TAAAG GAGCA ATAAC CG	<i>psbA</i> -mRNA ¹ , +1057/+1081
rbcL-1	GGTCT ACTCG ACATA AATTA GG	<i>rbcL</i> -mRNA ^{1,2} , -77/-50
rbcL-2	GGACT TACTC GGAAT GCTGC C	<i>rbcL</i> -mRNA ^{1,2} , +110/+130
rbcL-A	AGTCA TGGTA AAATC CTTGG TTTAT TTAAT A	<i>rbcL</i> -mRNA ³ , -25/+6
psaA-1	GCATC AGCAT GTAGG TTCCA GATCC AAG	<i>psaA</i> -mRNA ^{2,3} , +131/+158
atpB-1	TCTCA TAATA TATAG TAAAG TATGT CG	<i>atpB</i> -mRNA ^{2,3} , -21/+6
16S-1	GTCTC AGTCC CAGTG TGGCT GATCA	16S-rRNA ^{1,2,3} , 275—299
trnH-1	GGCGA ACGAC GGGAA TTGAA C	tRNA _{His} ¹ , 55—75

Tabelle 7.1: **Oligonukleotide, die zum RNA-Nachweis in Northern-Analysen verwendet wurden.** (siehe Kap. 3.2.6) Spezies-Spezifitäten: ¹Spinat - ²Tabak - ³*Arabidopsis*. Die Positionsangaben beziehen sich bei mRNAs auf den Translationstartpunkt, bei rRNA und tRNA auf das 5'-Ende der reifen RNA.

7.1.2 Primer zur PCR-Herstellung von Transkriptionsmatrizen

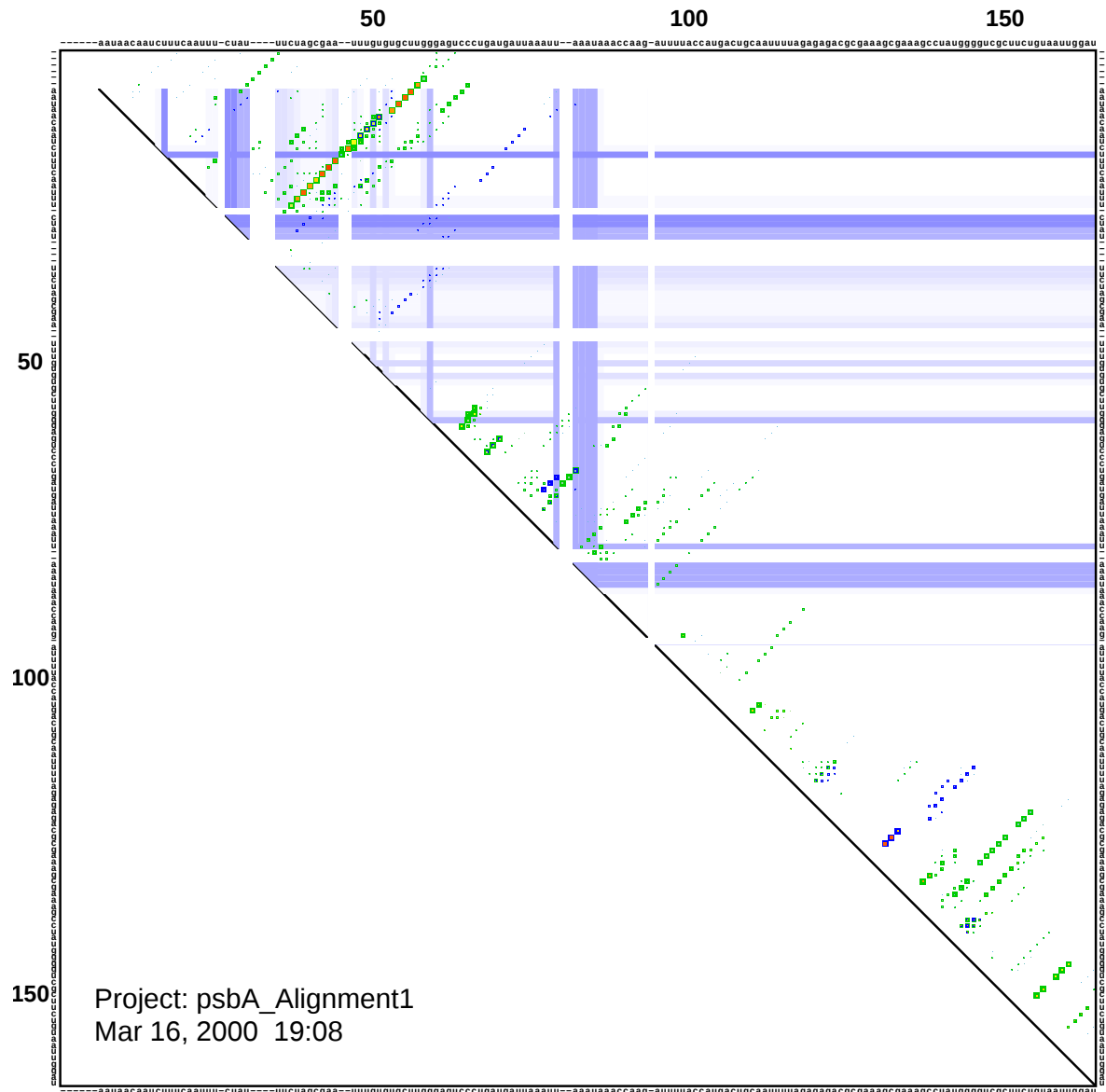
PCR-Produkt (Transkriptionsmatrize)	Primer	Sequenz 5' → 3'
psbA ^{VL}	psbA-α5'T7	*ATAAC AATCT TTCAA TTCAA TTTCT ATTTC T
	psbA-3'	ACTAG TAAAG GAGCA ATAAC CGATT TCTTG
psbAα5'H	psbA-α5'H-T7	*GAGCC GCCGA ATACA CACCA GCTAC
	psbA-5'	ATAAC AATCT TTCAA TTCAA TTTCT ATTTC
psbAα3'H	psbA-α3'H-T7	*ACTAG TAAAG GAGCA ATAAC CGATT TCTTG
	psbA-3'H	GTTCC TTGGT AACTT CTAGT TTGAT CA
psbAα284	psbA-α284-T7	*TGGAT AAAAG TGCAA CCCTA TAGCT
	psbA-5'	ATAAC AATCT TTCAA TTCAA TTTCT ATTTC
psbAα115	psbA-α115-T7	*CATCA AAACA CAAA CCATC CAATG
	psbA-5'	ATAAC AATCT TTCAA TTCAA TTTCT ATTTC
		*mit T7-Promotorsequenz: GCGCC AGATC TTAAT ACGAC TCACT ATAGG

Tabelle 7.2: Oligonukleotide (Primer), die für die Herstellung transkribierbarer PCR-Produkte verwendet wurden. (siehe Kap. 3.2.4)

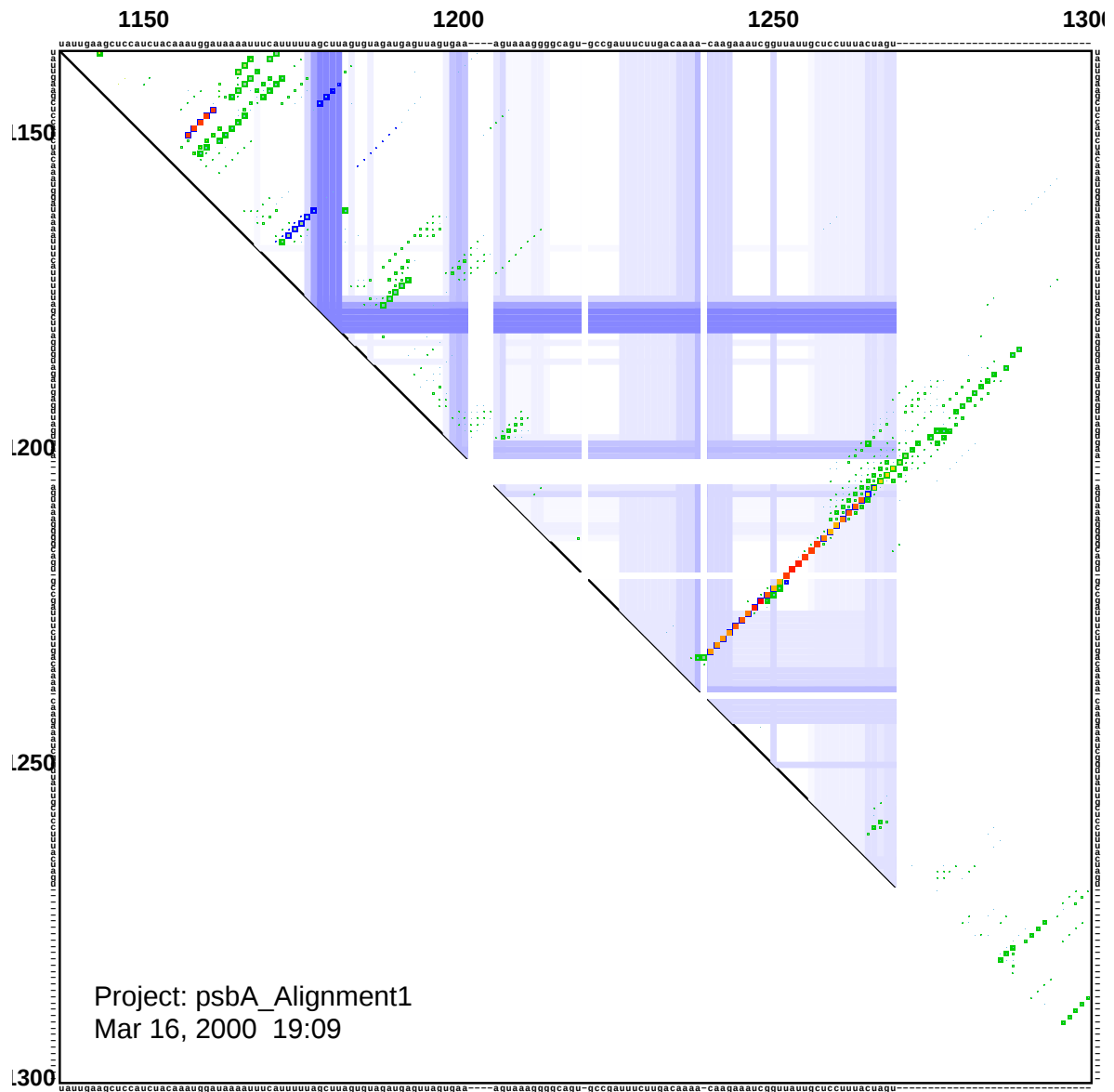
7.2 Dotplot-Darstellungen der Strukturelemente innerhalb der untranslatierten Regionen der *psbA*- und *rbcL*-mRNA

Der Consensus-Dotplot stellt die Überlagerung der Basenpaarwahrscheinlichkeitsmatrizen der homologen Einzelsequenzen im Rahmen des Programms CONSTRUCT dar (siehe Kap. 3.4). Dabei ist die Größe eines Punktes in der Matrix ein Maß für die Wahrscheinlichkeit eines Basenpaars. Die Lücken einzelner Sequenzen im Alignment sind durch blaue Balken wiedergegeben, je intensiver die Färbung desto häufiger kommt an der entsprechenden Stelle im Alignment eine Lücke vor.

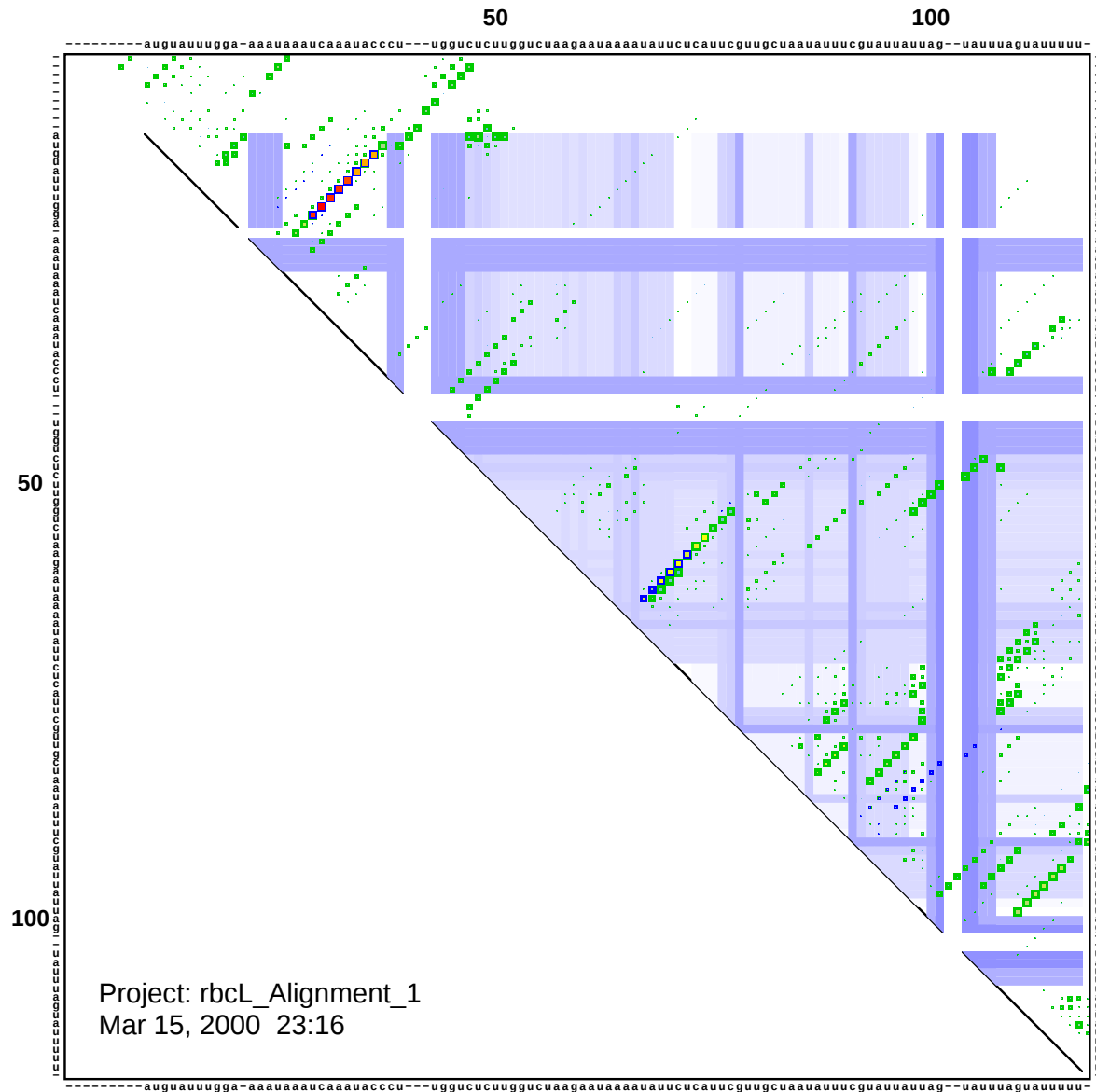
Farbkodierung der Basenpaar-„Dots“: — Grün: Basenpaare, die in einzelnen Sequenzen vorkommen — Blau: Basenpaare, die zu der Sequenz gehören, die an den Rändern der Matrix dargestellt ist (hier ist die Spinat-Sequenz angegeben). — Gelb bis Rot: Konservierte Basenpaare; je tiefer die Rotfärbung, desto stärker ist das betreffende Basenpaar konserviert.



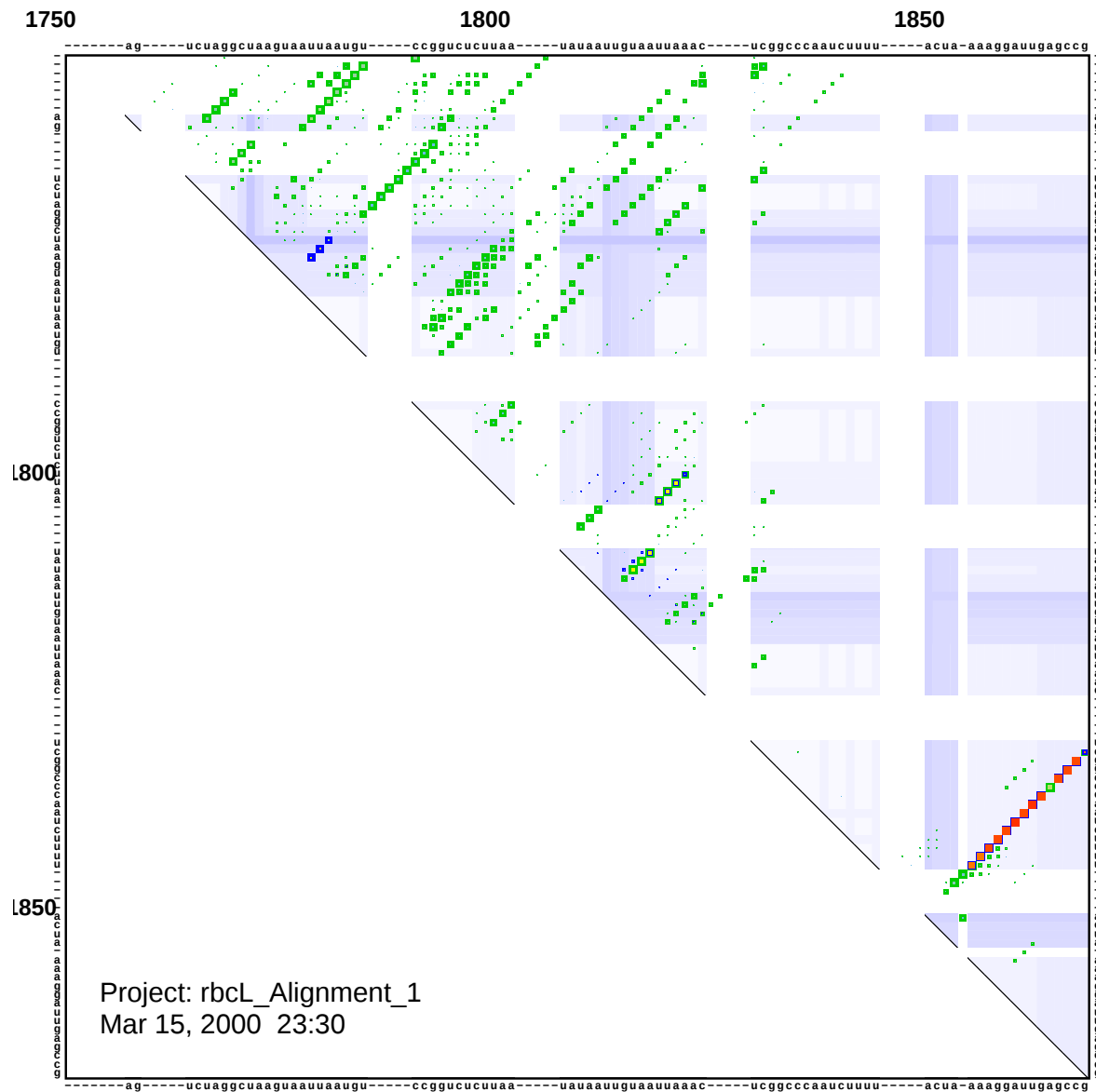
Consensus-Dotplot der 5'-untranslatierten Region der *psbA*-mRNA
(Spinat)



Consensus-Dotplot der 3'-untranslatierten Region der *psbA*-mRNA
(Spinat)



Consensus-Dotplot der 5'-untranslatierten Region der *rbcL*-mRNA
(Spinat)



Consensus-Dotplot der 3'-untranslatierten Region der *rbcL*-mRNA
(Spinat)

7.3 Alignment der *psbA*- und *rbcL*-Sequenzen inklusive konservierter Sekundärstrukturen

Auf den folgenden Seiten sind die Alignments der *psbA*- und *rbcL*-mRNA-Sequenzen dargestellt, die im Rahmen der Vorhersage konservierter Sekundärstruktur Verwendung fanden. Die Darstellung entspricht der Ausgabe des Programms CONSTRUCTALIGN (siehe Kap. 3.4.1). — Unterhalb der Sequenzen ist die Consensussequenz und die Consensusstruktur in Klammernotation angegeben. Strukturelemente sind im Alignment rot hervorgehoben. Die Farbkodierung der konservierten Strukturen gibt auch die Basenpaarungswahrscheinlichkeit an: Je tiefer die Rotfärbung desto höher ist die Wahrscheinlichkeit.

Die Alignments wurden im Rahmen der Identifizierung konservierter Strukturelemente geringfügig im Bereich der untranslatierten Regionen der mRNAs modifiziert (siehe Kap. 4.2); daher sind jeweils die unveränderte und optimierte Version des Alignments wiedergegeben.

Project: psbA_Alignment_raw; Date: Mar 16, 2000 18:36

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
b-napus	...	AACAAG	CUC UCAA	UUAUCU	cu	...	uaUag	Uuuu	...	GaGa	a
s-alba	AAUAACAAGC	UCUAA	UUAUCU	cu	...	uuAAGU	UU	uaGa	G	UUG	ugugc
a-thaliana	...	AACAAGC	UCUCAA	UUAUCU	cu	...	uuu	...	SaGa	a	UUG
n-debneyi	AAUAACAAGC	UCUAA	UUAUCU	cu	...	uuu	uaUag	UUA	Aa	Ua	Gu
n-plumbagin	AAUAACAAGC	UCUAA	UUAUCU	cu	...	uuu	uaUag	UUA	Aa	Ua	Gu
n-glutinosa	AAUAACAAGC	UCUAA	UUAUCU	cu	...	uuu	uaUag	UUA	Aa	Ua	Gu
n-tabacum	AAUAACAAGC	UCUAA	UUAUCU	cu	...	uuu	uaUag	UUA	Aa	Ua	Gu
s-niger	AAUAACAAGC	UCUAA	UUAUCU	cu	...	uuu	uaUag	UUA	Aa	Ua	Gu
g-hirsutum	...	AACAAGC	UCUAA	UUAUCU	cu	...	uuu	uaUag	UUA	Aa	Ua
s-oleracea	AAUAACAAGC	UCUAA	UUAUCU	cu	...	uuu	uaUag	UUA	Aa	Ua	Gu
p-sativum	...	aAa	AaC	CUUa	A	...	UuUa	Ag	Aga	a	Uc
v-faba	uAUAACAAGC	Cc Uu	AA	UuUa	Ua	Ag	...	UUCU	AG	AA	Uu
g-max	...	AACAAGC	Cc UCAA	UuUa	Ua	Ag	...	UUCU	AG	AA	Uu
h-vulgare	...	AACA	Au	CCUu	Cu	A	...	UuUa	Ua	Ag	...
s-cereale	AAUAACAAGC	UCUAA	UUAUCU	cu	...	uuu	uaUag	UUA	Aa	Ua	Gu
o-sativa	AAUAACAAGC	UCUAA	UUAUCU	cu	...	uuu	uaUag	UUA	Aa	Ua	Gu
z-mays	AAUAACAAGC	UCUAA	UUAUCU	cu	...	uuu	uaUag	UUA	Aa	Ua	Gu
Cons. seq.	a	AUAACAAGC	UCUAA	UUAUCU	cu	...	uuu	uaUag	UUA	Aa	Ua
Cons. struct.	aaaaa	bb	ccccccc	bb	aaaaa						
Cons. struct.	(((((	((	(((((	((	(((((	((	((	((	((	((	((

	101	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
b-napus	CCAUGACUGCA	AAUUUAGAGAGAC	CGSAAAG	CGAAAGCCU	AUGGGUGC	UUCUGUA	ACUGGAU	AACU	AGU	ACUG	AAA
s-alba	CCAUGACUGCA	AAUUUAGAGAGAC	CGSAAAG	CGAAAGCCU	AUGGGUGC	UUCUGUA	ACUGGAU	AACU	AGU	ACUG	AAA
a-thaliana	CCAUGACUGCA	AAUUUAGAGAGAC	CGSAAAG	CGAAAGCCU	AUGGGUGC	UUCUGUA	ACUGGAU	AACU	AGU	ACUG	AAA
n-debneyi	CCAUGACUGCA	AAUUUAGAGAGAC	CGSAAAG	CGAAAGCCU	AUGGGUGC	UUCUGUA	ACUGGAU	AACU	AGU	ACUG	AAA
n-plumbagin	CCAUGACUGCA	AAUUUAGAGAGAC	CGSAAAG	CGAAAGCCU	AUGGGUGC	UUCUGUA	ACUGGAU	AACU	AGU	ACUG	AAA
n-glutinosa	CCAUGACUGCA	AAUUUAGAGAGAC	CGSAAAG	CGAAAGCCU	AUGGGUGC	UUCUGUA	ACUGGAU	AACU	AGU	ACUG	AAA
n-tabacum	CCAUGACUGCA	AAUUUAGAGAGAC	CGSAAAG	CGAAAGCCU	AUGGGUGC	UUCUGUA	ACUGGAU	AACU	AGU	ACUG	AAA
s-niger	CCAUGACUGCA	AAUUUAGAGAGAC	CGSAAAG	CGAAAGCCU	AUGGGUGC	UUCUGUA	ACUGGAU	AACU	AGU	ACUG	AAA
g-hirsutum	CCAUGACUGCA	AAUUUAGAGAGAC	CGSAAAG	CGAAAGCCU	AUGGGUGC	UUCUGUA	ACUGGAU	AACU	AGU	ACUG	AAA
s-oleracea	CCAUGACUGCA	AAUUUAGAGAGAC	CGSAAAG	CGAAAGCCU	AUGGGUGC	UUCUGUA	ACUGGAU	AACU	AGU	ACUG	AAA
p-sativum	CCAUGACUGCA	AAUUUAGAGAGAC	CGSAAAG	CGAAAGCCU	AUGGGUGC	UUCUGUA	ACUGGAU	AACU	AGU	ACUG	AAA
v-faba	CCAUGACUGCA	AAUUUAGAGAGAC	CGSAAAG	CGAAAGCCU	AUGGGUGC	UUCUGUA	ACUGGAU	AACU	AGU	ACUG	AAA
g-max	CCAUGACUGCA	AAUUUAGAGAGAC	CGSAAAG	CGAAAGCCU	AUGGGUGC	UUCUGUA	ACUGGAU	AACU	AGU	ACUG	AAA
h-vulgare	CCAUGACUGCA	AAUUUAGAGAGAC	CGSAAAG	CGAAAGCCU	AUGGGUGC	UUCUGUA	ACUGGAU	AACU	AGU	ACUG	AAA
s-cereale	CCAUGACUGCA	AAUUUAGAGAGAC	CGSAAAG	CGAAAGCCU	AUGGGUGC	UUCUGUA	ACUGGAU	AACU	AGU	ACUG	AAA
o-sativa	CCAUGACUGCA	AAUUUAGAGAGAC	CGSAAAG	CGAAAGCCU	AUGGGUGC	UUCUGUA	ACUGGAU	AACU	AGU	ACUG	AAA
z-mays	CCAUGACUGCA	AAUUUAGAGAGAC	CGSAAAG	CGAAAGCCU	AUGGGUGC	UUCUGUA	ACUGGAU	AACU	AGU	ACUG	AAA
Cons. seq.	CCAUGACUGCA	AAUUUAGAGAGAC	CGSAAAG	CGAAAGCCU	AUGGGUGC	UUCUGUA	ACUGGAU	AACU	AGU	ACUG	AAA
Cons. struct.			dd	dd				eeeeeeee	ffffff	ffffff	ffffff
Cons. struct.	((	((	((	((	((	((	((	((	((	((	((

	201	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
b-napus	UGGUGU	UUUGAUG	AUCCUAC	CUUUAUG	ACCGCA	AUCUCC	GUUUUUAU	UACGCA	UUCAUUG	UCUGC	UCCUCC
s-alba	UGGUGU	UUUGAUG	AUCCUAC	CUUUAUG	ACCGCA	AUCUCC	GUUUUUAU	UACGCA	UUCAUUG	UCUGC	UCCUCC
a-thaliana	UGGUGU	UUUGAUG	AUCCUAC	CUUUAUG	ACCGCA	AUCUCC	GUUUUUAU	UACGCA	UUCAUUG	UCUGC	UCCUCC
n-debneyi	UGGUGU	UUUGAUG	AUCCUAC	CUUUAUG	ACCGCA	AUCUCC	GUUUUUAU	UACGCA	UUCAUUG	UCUGC	UCCUCC
n-plumbagin	UGGUGU	UUUGAUG	AUCCUAC	CUUUAUG	ACCGCA	AUCUCC	GUUUUUAU	UACGCA	UUCAUUG	UCUGC	UCCUCC
n-glutinosa	UGGUGU	UUUGAUG	AUCCUAC	CUUUAUG	ACCGCA	AUCUCC	GUUUUUAU	UACGCA	UUCAUUG	UCUGC	UCCUCC
n-tabacum	UGGUGU	UUUGAUG	AUCCUAC	CUUUAUG	ACCGCA	AUCUCC	GUUUUUAU	UACGCA	UUCAUUG	UCUGC	UCCUCC
s-niger	UGGUGU	UUUGAUG	AUCCUAC	CUUUAUG	ACCGCA	AUCUCC	GUUUUUAU	UACGCA	UUCAUUG	UCUGC	UCCUCC
g-hirsutum	UGGUGU	UUUGAUG	AUCCUAC	CUUUAUG	ACCGCA	AUCUCC	GUUUUUAU	UACGCA	UUCAUUG	UCUGC	UCCUCC
s-oleracea	UGGUGU	UUUGAUG	AUCCUAC	CUUUAUG	ACCGCA	AUCUCC	GUUUUUAU	UACGCA	UUCAUUG	UCUGC	UCCUCC
p-sativum	UGGUGU	UUUGAUG	AUCCUAC	CUUUAUG	ACCGCA	AUCUCC	GUUUUUAU	UACGCA	UUCAUUG	UCUGC	UCCUCC
v-faba	UGGUGU	UUUGAUG	AUCCUAC	CUUUAUG	ACCGCA	AUCUCC	GUUUUUAU	UACGCA	UUCAUUG	UCUGC	UCCUCC
g-max	UGGUGU	UUUGAUG	AUCCUAC	CUUUAUG	ACCGCA	AUCUCC	GUUUUUAU	UACGCA	UUCAUUG	UCUGC	UCCUCC
h-vulgare	UGGUGU	UUUGAUG	AUCCUAC	CUUUAUG	ACCGCA	AUCUCC	GUUUUUAU	UACGCA	UUCAUUG	UCUGC	UCCUCC
s-cereale	UGGUGU	UUUGAUG	AUCCUAC	CUUUAUG	ACCGCA	AUCUCC	GUUUUUAU	UACGCA	UUCAUUG	UCUGC	UCCUCC
o-sativa	UGGUGU	UUUGAUG	AUCCUAC	CUUUAUG	ACCGCA	AUCUCC	GUUUUUAU	UACGCA	UUCAUUG	UCUGC	UCCUCC
z-mays	UGGUGU	UUUGAUG	AUCCUAC	CUUUAUG	ACCGCA	AUCUCC	GUUUUUAU	UACGCA	UUCAUUG	UCUGC	UCCUCC
Cons. seq.	UGGUGU	UUUGAUG	AUCCUAC	CUUUAUG	ACCGCA	AUCUCC	GUUUUUAU	UACGCA	UUCAUUG	UCUGC	UCCUCC
Cons. struct.	eeeeeee							ggggg	hhhhh	iiiiii	jjjjj
Cons. struct.	(((((	((	((	((	((	((	((	((	((	((	((

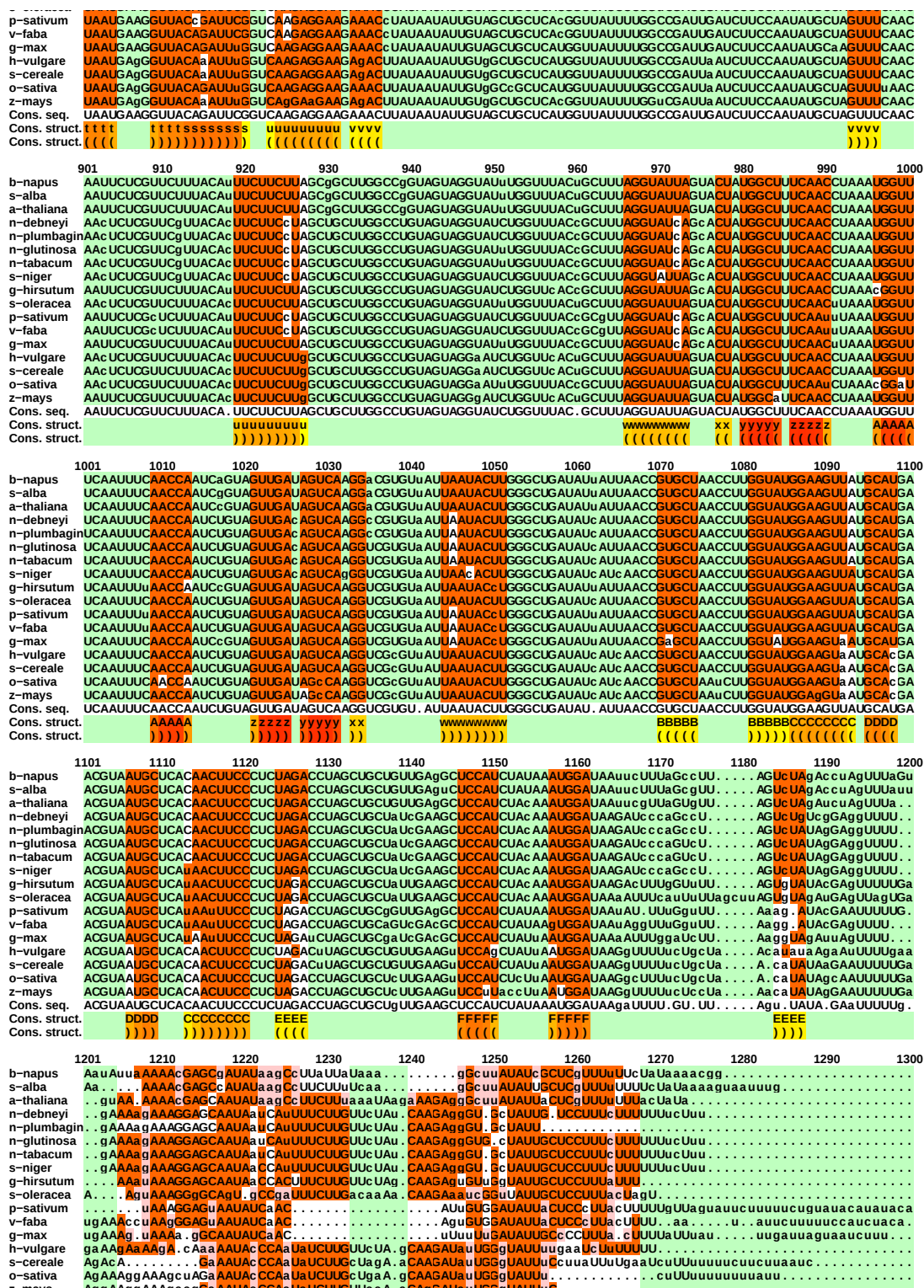
	301	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
b-napus	GUUUCUG	GAUCUCU	CUUUAAC	SGAAACA	AUUAUUU	Ca	GGUGCCA	AUUAUUC	CUACU	UCUGCa	GCUAU
s-alba	GUUUCUG	GAUCUCU	CUUUAAC	SGAAACA	AUUAUUU	Ca	GGUGCCA	AUUAUUC	CUACU	UCUGCa	GCUAU
a-thaliana	GUUUCUG	GAUCUCU	CUUUAAC	SGAAACA	AUUAUUU	Ca	GGUGCCA	AUUAUUC	CUACU	UCUGCa	GCUAU
n-debneyi	GUUUCUG	GAUCUCU	CUUUAAC	SGAAACA	AUUAUUU	Ca	GGUGCCA	AUUAUUC	CUACU	UCUGCa	GCUAU
n-plumbagin	GUUUCUG	GAUCUCU	CUUUAAC	SGAAACA	AUUAUUU	Ca	GGUGCCA	AUUAUUC	CUACU	UCUGCa	GCUAU
n-glutinosa	GUUUCUG	GAUCUCU	CUUUAAC	SGAAACA	AUUAUUU	Ca	GGUGCCA	AUUAUUC	CUACU	UCUGCa	GCUAU
n-tabacum	GUUUCUG	GAUCUCU	CUUUAAC	SGAAACA	AUUAUUU	Ca	GGUGCCA	AUUAUUC	CUACU	UCUGCa	GCUAU
s-niger	GUUUCUG	GAUCUCU	CUUUAAC	SGAAACA	AUUAUUU	Ca	GGUGCCA	AUUAUUC	CUACU	UCUGCa	GCUAU
g-hirsutum	GUUUCUG	GAUCUCU	CUUUAAC	SGAAACA	AUUAUUU	Ca	GGUGCCA	AUUAUUC	CUACU	UCUGCa	GCUAU
s-oleracea	GUUUCUG	GAUCUCU	CUUUAAC	SGAAACA	AUUAUUU	Ca	GGUGCCA	AUUAUUC	CUACU	UCUGCa	GCUAU
p-sativum	GUUUCUG	GAUCUCU	CUUUAAC	SGAAACA	AUUAUUU	Ca	GGUGCCA	AUUAUUC	CUACU	UCUGCa	GCUAU
v-faba	GUUUCUG	GAUCUCU	CUUUAAC	SGAAACA	AUUAUUU	Ca	GGUGCCA	AUUAUUC	CUACU	UCUGCa	GCUAU
g-max	GUUUCUG	GAUCUCU	CUUUAAC	SGAAACA	AUUAUUU	Ca	GGUGCCA	AUUAUUC	CUACU	UCUGCa	GCUAU
h-vulgare	GUUUCUG	GAUCUCU	CUUUAAC	SGAAACA	AUUAUUU	Ca	GGUGCCA	AUUAUUC	CUACU	UCUGCa	GCUAU
s-cereale	GUUUCUG	GAUCUCU	CUUUAAC	SGAAACA	AUUAUUU	Ca	GGUGCCA	AUUAUUC	CUACU	UCUGCa	GCUAU
o-sativa	GUUUCUG	GAUCUCU	CUUUAAC	SGAAACA	AUUAUUU	Ca	GGUGCCA	AUUAUUC	CUACU	UCUGCa	GCUAU
z-mays	GUUUCUG	GAUCUCU	CUUUAAC	SGAAACA	AUUAUUU	Ca	GGUGCCA	AUUAUUC	CUACU	UCUGCa	GCUAU
Cons. seq.	GUUUCUG	GAUCUCU	CUUUAAC	SGAAACA	AUUAUUU	Ca	GGUGCCA	AUUAUUC	CUACU	UCUGCa	GCUAU
Cons. struct.	iiiiiii							kkkkk	lllll	mmmm	nnnn
Cons. struct.	(((((	((	((	((	((	((	((	((	((	((	((

	401	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
b-napus	CAUCGUG	UAGUAG	GAUGG	GUUAACA	CGUGG	UCCUUA	UAGAAC	CUAAUUG	UUUACAC	UUUUUA	CUUGG
s-alba	CAUCGUG	UAGUAG	GAUGG	GUUAACA	CGUGG	UCCUUA	UAGAAC	CUAAUUG	UUUACAC	UUUUUA	CUUGG
a-thaliana	CAUCGUG	UAGUAG	GAUGG	GUUAACA	CGUGG	UCCUUA	UAGAAC	CUAAUUG	UUUACAC	UUUUUA	CUUGG

psbA-mRNA: unverändertes Alignment, Teil 1

n-debneyi	CAUCCGUGAUGAAUGGUUAUACAACGGUGGCCUUAUGAACUAUUGUUCUACACUUCUACUUGGc GUAGCUUGUUAU AUGGUGUGAGUGGGAg CU
n-plumbagin	CAUCCGUGAUGAAUGGUUAUACAACGGUGGCCUUAUGAACUAUUGUUCUACACUUCUACUUGGc GUAGCUUGUUAU AUGGUGUGAGUGGGAg CU
n-glutinosa	CAUCCGUGAUGAAUGGUUAUACAACGGUGGCCUUAUGAACUAUUGUUCUACACUUCUACUUGGc GUAGCUUGUUAU AUGGUGUGAGUGGGAg CU
n-tabacum	CAUCCGUGAUGAAUGGUUAUACAACGGUGGCCUUAUGAACUAUUGUUCUACACUUCUACUUGGc GUAGCUUGUUAU AUGGUGUGAGUGGGAg CU
s-niger	CAUCCGUGAUGAAUGGUUAUACAACGGUGGCCUUAUGAACUAUUGUUCUACACUUCUACUUGGc GUAGCUUGUUAU AUGGUGUGAGUGGGAg CU
g-hirsutum	CAUCuGUUGAUGAAUGGUUAUACAAGGc GGUCUUAUGAGu UAAUUGUuu UACACUUCUACUUGGUGUAGCUUGUUAU AUGGUGUGAGUGGGAAACU
s-oleracea	CAUCgGUUGAUGAAUGGUUAUACAAGGUGGCCUUAUGAACUAUUGUUCUACACUUCUACUUGGUGUAGCUUGUUAU AUGGUGUGAGUGGGAAACU
p-sativum	CAUCCGUGAUGAAUGGUUAUACAACGGc GGUCUUAUGAACUAUUGUUCUACACUUCUACUUGGUGUAGCUUGUUAU AUGGUGUGAGUGGGAAACU
v-faba	CAUCCGUGAUGAAUGGUUAUACAAGGUGGCCUUAUGAACUAUUGUUCUACACUUCUACUUGGUGUAGCUUGUUAU AUGGUGUGAGUGGGAAACU
g-max	CAUCuGUUGAUGAAUGGUUAUACAAGGc GGUCUUAUGAACUAUUGUUCUACACUUCUACUUGGUGUAGCUUGc UA AUGGg CGUGAGUGGGAAACU
h-vulgare	CAUCuGUUGAUGAAUGGUUAUACAAGGUGGCCUUAUGAG CUAUUGUUCUACACUUCUACUUGGUGUAGCUUGUUAU AUGGUGUGAGUGGGAAACU
s-cereale	CAUCuGUUGAUGAAUGGUUAUACAAGGUGGCCUUAUGAG CUAUUGUUCUACACUUCUACUUGGUGUAGCUUGUUAU AUGGUGUGAGUGGGAAACU
o-sativa	CAUCuGUUGAUGAAUGGUUAUACAAGGUGGCCUUAUGAG CUAUUGUUCUACACUUCUACUUGGUGUAGCUUGUUAU AUGGUGUGAGUGGGAAACU
z-mays	CAUCuGUUGAUGAAUGGUUAUACAAGGc GGUCUUAUGAG CUAUUGUUCUACACUUCUACUUGGUGUAGCUUGUUAU AUGGUGUGAGUGGGAAACU
Cons. seq.	CAUCc GUUGAUGAAUGGUUAUACAAGGUGGCCUUAUGAACUAUUGUUCUACACUUCUACUUGGUGUAGCUUGUUAU AUGGUGUGAGUGGGAAACU
Cons. struct.	k
Cons. struct.	j
b-napus	501 UAGUUUCGUCUGGGUAGUGCGu CCUUGGAUUGCUGUUGCAUAUUCAGCUCUGUUGCAGCUGCUACUGCUG UUUUCUUGAUUACCCAAUUGGUAAGGA
s-alba	UAGUUUCGUCUGGGUAGUGCGc CCUUGGAUUGCUGUUGCAUAUUCAGCUCUGUUGCAGCUGCUACUGCUG UUUUCUUGAUUACCCAAUUGGUAAGGA
a-thaliana	UAGUUUCGUCUGGGUAGUGCGu CCUUGGAUUGCUGUUGCAUAUUCAGCUCUGUUGCAGCUGCG Cg ACUGCUG UUUUCUUGAUUACCCAAUUGGUAAGGA
n-debneyi	UAGUUUCGUCUGGGUAGUGCGa CCUUGGAUUGCUGUUGCAUAUUCAGCUCUGUUGCAGCUGCUACc GcAg UUUUCUUGAUUACCCAAUUGGUAAGGA
n-plumbagin	UAGUUUCGUCUGGGUAGUGCGa CCUUGGAUUGCUGUUGCAUAUUCAGCUCUGUUGCAGCUGCUACc GcAg UUUUCUUGAUUACCCAAUUGGUAAGGA
n-glutinosa	UAGUUUCGUCUGGGUAGUGCGa CCUUGGAUUGCUGUUGCAUAUUCAGCUCUGUUGCAGCUGCUACc GcAg UUUUCUUGAUUACCCAAUUGGUAAGGA
n-tabacum	UAGUUUCGUCUGGGUAGUGCGa CCUUGGAUUGCUGUUGCAUAUUCAGCUCUGUUGCAGCUGCUACc GcAg UUUUCUUGAUUACCCAAUUGGUAAGGA
s-niger	UAGc UUCUGUCUGGGUAGUGCGa CCUUGGAUUGCUGUUGCAUAUUCAGCUCUGUUGCAGCUGCUACc GcAg UUUUCUUGAUUACCCAAUUGGUAAGGA
g-hirsutum	UAGUUUCGUCUGGGUAGUGCGc CCUUGGAUUGCUGUUGCAUAUUCAGCUCUGUUGCAGCUGCUACc GcUG UUUUCUUGAUUACCCAAUUGGUAAGGA
s-oleracea	UAGUUUCGUCUGGGUAGUGCGc CCUUGGAUUGCUGUUGCAUAUUCc GcUGCa GUUGCAGCG Cg ACUGCUG UUUUCUUGAUUACCCAAUUGGUAAGGA
p-sativum	UAGUUUCGUCUGGGUAGUGCGc CCUUGGAUUGCUGUUGCAUAUUCAGCUCUGc GUUGCAGCUGCUACUGCaG UUUUCUUGAUUACCCAAUUGGUAAGGA
v-faba	UAGUUUCGUCUGGGUAGUGCGc CCUUGGAUUGUUGUUGCAUAUUCAGCUCUGc GUc GcAGCUGCUACUGCaG UUUUCUUGAUUACCCAAUUGGUAAGGA
g-max	UAGUUUCGUCUGGGUAGUGCGu CCUUGGAUUGCUGUUGCAUAUUCAGCUCUGUUGCAGCUGCUACUGCUG UUUUCUUGAUUACCCAAUUGGUAAGGA
h-vulgare	UAGUUUCGUCUGGGUAGUGCGu CCUUGGAUUGCUGUUGCAUAUUCAGCUCUGUUGCAGCUGCUACUGCUG UUUUCUUGAUUACCCu AUUGGUAAGGA
s-cereale	UAGUUUCGUCUGGGUAGUGCGu CCUUGGAUUGCUGUUGCAUAUUCAGCUCUGUUGCAGCUGCUACUGCUG UUUUCUUGAUUACCCu AUUGGUAAGGA
o-sativa	gAGUUUCGUCUGGGUAGUGCGu CCUUGGAUUGCUGUUGCAUAUUCAGCUCUGUUGCAGCUGCUACUGCUG UUUUCUUGAUUACCCu AUUGGUAAGGA
z-mays	UAGUUUCGUCUGGGUAGUGCGc CCUUGGAUUGCUGUUGCAUAUUCAGCUCUGUUGCAGCUGCUACUGCUG UUUUCUUGAUUACCCu AUUGGUAAGGA
Cons. seq.	UAGUUUCGUCUGGGUAGUGCG . CCUUGGAUUGCUGUUGCAUAUUCAGCUCUGUUGCAGCUGCUACUGCUGUUUUUCUUGAUUACCCAAUUGGUAAGGA
Cons. struct.	mm
Cons. struct.	j
b-napus	601 AGUUUUUCUGAUGGUUAUGCCUCUAGGAUAUCUGG UACUUUAACUUUAUGAUGUAU UCCAGGUGAGCACAACAu CUUAGCACCCAAUUCACAUGU
s-alba	AGUUUUUCUGAUGGUUAUGCCUCUAGGAUAUCUGG UACUUUAACUUUAUGAUGUAU UCCAGGUGAGCACAACAu CUUAGCACCCAAUUCACAUGU
a-thaliana	AGUUUUUCUGAUGGUUAUGCCUCUAGGAUAUCUGG UACUUUAACUUUAUGAUGUAU UCCAGGUGAGCACAACAu CUUAGCACCCAAUUCACAUGU
n-debneyi	AGUUUUUCUGAUGGUUAUGCCUCUAGGAUAUCUGG UACUUUAACUUUAUGAUGUAU UCCAGGUGAGCACAACAu CUUAGCACCCAAUUCACAUGU
n-plumbagin	AGUUUUUCUGAUGGUUAUGCCUCUAGGAUAUCUGG UACUUUAACUUUAUGAUGUAU UCCAGGUGAGCACAACAu CUUAGCACCCAAUUCACAUGU
n-glutinosa	AGUUUUUCUGAUGGUUAUGCCUCUAGGAUAUCUGG UACUUUAACUUUAUGAUGUAU UCCAGGUGAGCACAACAu CUUAGCACCCAAUUCACAUGU
n-tabacum	AGUUUUUCUGAUGGUUAUGCCUCUAGGAUAUCUGG UACUUUAACUUUAUGAUGUAU UCCAGGUGAGCACAACAu CUUAGCACCCAAUUCACAUGU
s-niger	AGUUUUUCUGAUGGUUAUGCCUCUAGGAUAUCUGG UACUUUAACUUUAUGAUGUAU UCCAGGUGAGCACAACAu CUUAGCACCCAAUUCACAUGU
g-hirsutum	AGUUUUUCUGAUGGUUAUGCCUCUAGGAUAUCUGG UACUUUAACUUUAUGAUGUAU UCCAGGUGAGCACAACAu CUUAGCACCCAAUUCACAUGU
s-oleracea	AGc UUUUCAGAUGGUUAUGCCUCUAGGAUAUCUGG UACUUUAACUUUAUGAUGUAU UCCAGGUGAGCACAACAu CUUAGCACCCAAUUCACAUGU
p-sativum	AGc UUUUCAGAUGGUUAUGCCUCUAGGAUAUCUGG UACUUUAACUUUAUGAUGUAU UCCAGGUGAGCACAACAu CUUAGCACCCAAUUCACAUGU
v-faba	AGc UUUUCAGAUGGUUAUGCCUCUAGGAUAUCUGG UACUUUAACUUUAUGAUGUAU UCCAGGUGAGCACAACAu CUUAGCACCCAAUUCACAUGU
g-max	AGc UUUUCAGAUGGUUAUGCCUCUAGGAUAUCUGG UACUUUAACUUUAUGAUGUAU UCCAGGUGAGCACAACAu CUUAGCACCCAAUUCACAUGU
h-vulgare	AGc UUUUCUGAUGGUUAUGCCUu UAGGAUAUCUGG UACUUUAACUUUAUGAUGUAU UCCAGGUGAGCACAACAu CUUAGCACCCAAUUCACAUGU
s-cereale	AGc UUUUCUGAUGGUUAUGCCUu UAGGAUAUCUGG UACUUUAACUUUAUGAUGUAU UCCAGGUGAGCACAACAu CUUAGCACCCAAUUCACAUGU
o-sativa	AGUUUC UUGAUGGUUAUGCCUu UAGGAUAU UUGG UACUUUAACUUUAUGAUGUAU UCCAGGUGAGCACAACAu CUUAGCACCCAAUUCACAUGU
z-mays	AGUUUC UUGAUGGUUAUGCCUu UAGGAUAU UUGG UACUUUAACUUUAUGAUGUAU UCCAGGUGAGCACAACAu CUUAGCACCCAAUUCACAUGU
Cons. seq.	AGUUUUUCUGAUGGUUAUGCCUCUAGGAUAUCUGG UACUUUAACUUUAUGAUGUAU UCCAGGUGAGCACAACAu CUUAGCACCCAAUUCACAUGU
Cons. struct.	mm
Cons. struct.	j
b-napus	701 UAGGUGUAGCUGGUGUAUUCGGCGGCCUCCUUAUu AGUCUAUGCAUGG UGUUCCUUGGUAACUUCUAGUUUGAUCAGGG AAAc ACAGAAAAUGAAUCUGC
s-alba	UAGGUGUAGCUGGUGUAUUCGGCGGCCUCCUUAUu AGUCUAUGCAUGG UGUUCCUUGGUAACUUCUAGUUUGAUCAGGG AAAc ACAGAAAAUGAAUCUGC
a-thaliana	UAGGUGUAGCUGGUGUAUUCGGCGGCCUCCUUAUu AGUCUAUGCAUGG UGUUCCUUGGUAACUUCUAGUUUGAUCAGGG AAAc ACAGAAAAUGAAUCUGC
n-debneyi	UAGGc GUAGCUGGUGUAUUCGGCGGCCUCCUUAUUCAGUCUAUGCAUGG UGUUCCUUGGUAACUUCUAGUUUGAUCAGGG AAAc ACAGAAAAUGAAUCUGC
n-plumbagin	UAGGc GUAGCUGGUGUAUUCGGCGGCCUCCUUAUUCAGUCUAUGCAUGG UGUUCCUUGGUAACUUCUAGUUUGAUCAGGG AAAc ACAGAAAAUGAAUCUGC
n-glutinosa	UAGGc GUAGCUGGUGUAUUCGGCGGCCUCCUUAUUCAGUCUAUGCAUGG UGUUCCUUGGUAACUUCUAGUUUGAUCAGGG AAAc ACAGAAAAUGAAUCUGC
n-tabacum	UAGGc GUAGCUGGUGUAUUCGGCGGCCUCCUUAUUCAGUCUAUGCAUGG UGUUCCUUGGUAACUUCUAGUUUGAUCAGGG AAAc ACAGAAAAUGAAUCUGC
s-niger	UAGGc GUAGCUGGUGUAUUCGGCGGCCUCCUUAUUCAGUCUAUGCAUGG UGUUCCUUGGUAACUUCUAGUUUGAUCAGGG AAAc ACAGAAAAUGAAUCUGC
g-hirsutum	UAGGc GUAGCUGGUGUAUUCGGCGGCCUCCUUAUUCAGUCUAUGCAUGG UGUUCCUUGGUAACUUCUAGUUUGAUCAGGG AAAc ACAGAAAAUGAAUCUGC
s-oleracea	UAGGUGUAGCUGGUGUAUUCGGCGGCCUCCUUAUu AGUCUAUGCAUGG UGUUCCUUGGUAACUUCUAGUUUGAUCAGGG AAAc ACAGAAAAUGAAUCUGC
p-sativum	UAGGUGUAGCUGGUGUAUUCGGCGGCCUCCUUAUUCAGUCUAUGCAc GGUUCCUUGGUAACUUCUAGUUUGAUCAGGG AAAc ACAGAAAAUGAAUCUGC
v-faba	UAGGUGUAGCUGGUGUAUUCGGCGGCCUCCUUAUUCAGUCUAUGCAa GGUUCCUUGGUAACUUCUAGUUUGAUCAGGG AAAc ACAGAAAAUGAAUCUGC
g-max	UAGGUGUAGCUGGUGUAUUCGGCGGCCUCCUUAUUCAGUCUAUGCAUGG UGUUCCUUGGUAACUUCUAGUUUGAUCAGGG AAAc ACAGAAAAUGAAUCUGC
h-vulgare	UAGGUGUAGCUGGUGUAUUCGGCGGg UCCCUUAUCAGUCUAUGCAUGG UGUUCCUUGGUAACc UCUAGUUUGAUCAGGG AAAc ACuGAAAAUGAAUCUGC
s-cereale	UAGGUGUAGCUGGUGUAUUCGGCGGg UCCCUUAUCAGUCUAUGCAUGG UGUUCCUUGGUAACc UCUAGUUUGAUCAGGG AAAc ACuGAAAAUGAAUCUGC
o-sativa	UAGGUGUAGCUGGUGUAUUCGGCGGg UCCCUUAUCAGUCUAUGCAUGG UGUUCCUUGGUAACc UCUAGUUUGAUCAGGG AAAc ACuGAAAAUGAAUCUGC
z-mays	UAGGUGUAGCUGGUGUAUUCGGCGGg UCCCUUAUCAGUCUAUGCAUGG UGUUCCUUGGUAACc UCUAGUUUGAUCAGGG AAAc ACuGAAAAUGAAUCUGC
Cons. seq.	UAGGUGUAGCUGGUGUAUUCGGCGGCCUCCUUAUCAGUCUAUGCAUGG UGUUCCUUGGUAACUUCUAGUUUGAUCAGGG AAAc ACAGAAAAUGAAUCUGC
Cons. struct.	pp
Cons. struct.	j
b-napus	801 UAAUGAAGGUUACAGAUUCGGUc AAGAAAGAAACUUAc AAc AUUGUAGCUGCUCAc GGUUAAUUUGGCGAUUG AUUCUCCAUAUUGCUg GUUU CAAC
s-alba	UAAUGAAGGUUACAGAUUCGGUc AAGAAAGAAACUUAc AAc AUUGUAGCUGCUCAc GGUUAAUUUGGCGAUUG AUUCUCCAUAUUGCUg GUUU CAAC
a-thaliana	UAAUGAAGGUUACAGAUUCGGGc AAGAAAGAAACUUAc AAc AUUGUAGCUGCUCAc GGUUAAUUUGGCGAUUG AUUCUCCAUAUUGCUg GUUU CAAC
n-debneyi	UAAUGAAGGUUACAGAUUCGGUc AAGAGGAAGAAACUUAAAc AUc GUAGc GCUCUAGGUUAAUUUGGCGAUUG AUUCUCCAUAUUGCUg GUUU CAAC
n-plumbagin	UAAUGAAGGUUACAGAUUCGGUc AAGAGGAAGAAACUUAAAc AUc GUAGc GCUCUAGGUUAAUUUGGCGAUUG AUUCUCCAUAUUGCUg GUUU CAAC
n-glutinosa	UAAUGAAGGUUACAGAUUCGGUc AAGAGGAAGAAACUUAAAc AUc GUAGc GCUCUAGGUUAAUUUGGCGAUUG AUUCUCCAUAUUGCUg GUUU CAAC
n-tabacum	UAAUGAAGGUUACAGAUUCGGUc AAGAGGAAGAAACUUAAAc AUc GUAGc GCUCUAGGUUAAUUUGGCGAUUG AUUCUCCAUAUUGCUg GUUU CAAC
s-niger	UAAUGAAGGUUACAGAUUCGGUc AAGAGGAAGAAACUUAAUAUc GUAGc GCUCUAGGUUAAUUUGGCGAUUG AUUCUCCAUAUUGCUg GUUU CAAC
g-hirsutum	UAAUGAAGGUUACAGAUUCGGUc AAGAGGAAGAAACUUAAUAUc GUAGc GCUCUAGGUUAAUUUGGCGAUUG AUUCUCCAUAUUGCUg GUUU CAAC
s-oleracea	UAAUGAAGGUUACAGAUUCGGUc AAGAGGAAGAAACUUAAUAUc GUAGc GCUCUAGGUUAAUUUGGCGAUUG AUUCUCCAUAUUGCUg GUUU CAAC

psbA-mRNA: unverändertes Alignment, Teil 2



***psbA*-mRNA: unverändertes Alignment, Teil 3**

[illegible]

***psbA*-mRNA: unverändertes Alignment, Teil 4**

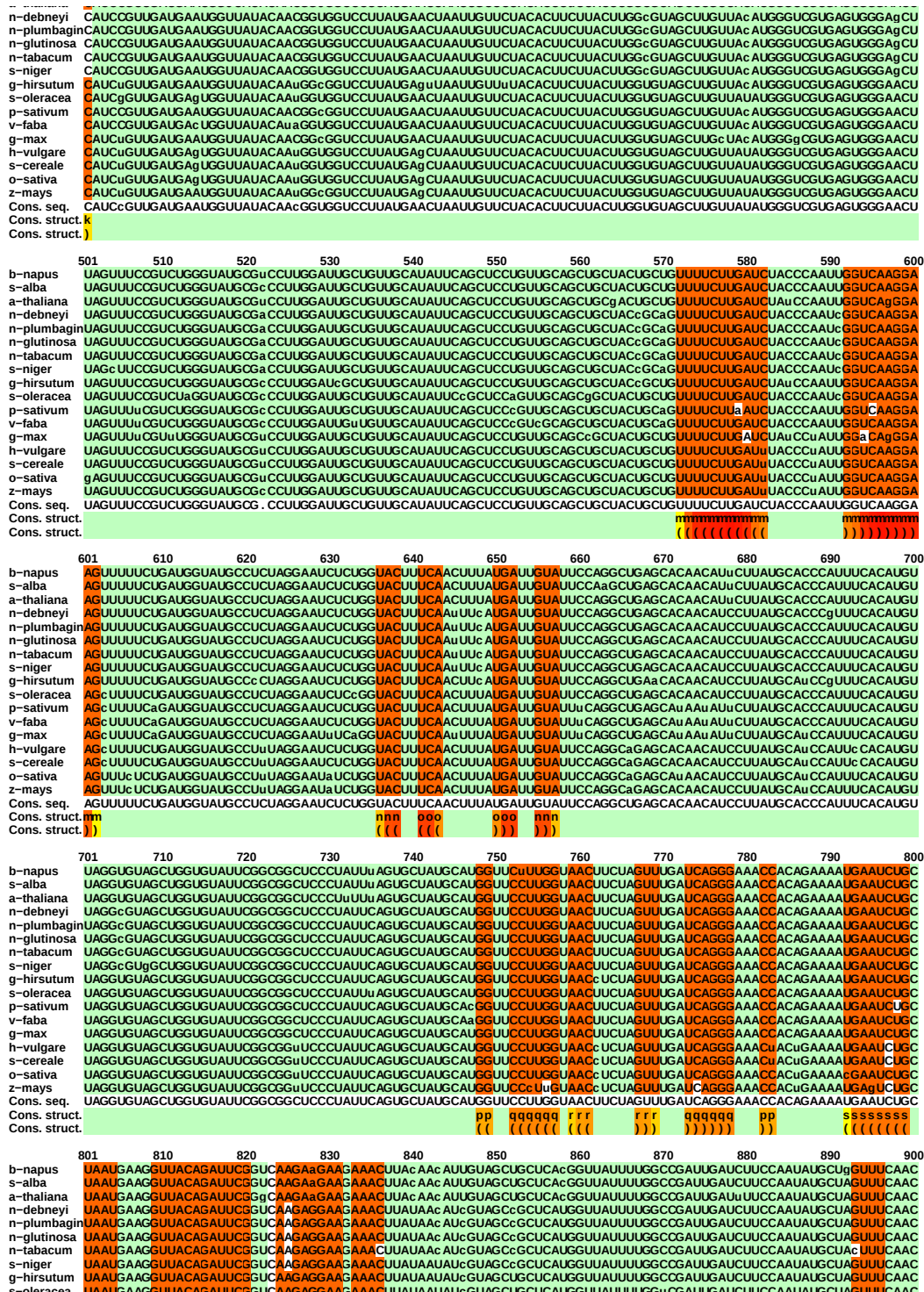
Project: psbA_Alignment1; Date: Mar 16, 2000 19:40

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100										
b-napus	..	AACAAG	CUC UCAA	UUAUCU	cu	..	uaUag	Uuuu	..	GaGa	a	UUUG	ugugc	Uugggg	Uucc	Ug	Auga	uuuuuu	AAACCAAG	G	AUUUUU
s-alba	aa	UAACAAG	CUC UCAA	UUAUCU	cu	..	uaUag	Uuuu	..	GaGa	a	UUUG	ugugc	Uugggg	Uucc	Ug	Auga	uuuuuu	AAACCAAG	G	AUUUUU
a-thaliana	..	AACAAG	CUC UCAA	UUAUCU	cu	..	uaUag	Uuuu	..	GaGa	a	UUUG	ugugc	Uugggg	Uucc	Ug	Auga	uuuuuu	AAACCAAG	G	AUUUUU
n-debneyi	aa	UAACAAG	CUC UCAA	UUAUCU	cu	..	uaUag	Uuuu	..	GaGa	a	UUUG	ugugc	Uugggg	Uucc	Ug	Auga	uuuuuu	AAACCAAG	G	AUUUUU
n-plumbagina	aa	UAACAAG	CUC UCAA	UUAUCU	cu	..	uaUag	Uuuu	..	GaGa	a	UUUG	ugugc	Uugggg	Uucc	Ug	Auga	uuuuuu	AAACCAAG	G	AUUUUU
n-glutinosa	aa	UAACAAG	CUC UCAA	UUAUCU	cu	..	uaUag	Uuuu	..	GaGa	a	UUUG	ugugc	Uugggg	Uucc	Ug	Auga	uuuuuu	AAACCAAG	G	AUUUUU
n-tabacum	aa	UAACAAG	CUC UCAA	UUAUCU	cu	..	uaUag	Uuuu	..	GaGa	a	UUUG	ugugc	Uugggg	Uucc	Ug	Auga	uuuuuu	AAACCAAG	G	AUUUUU
s-niger	aa	UAACAAG	CUC UCAA	UUAUCU	cu	..	uaUag	Uuuu	..	GaGa	a	UUUG	ugugc	Uugggg	Uucc	Ug	Auga	uuuuuu	AAACCAAG	G	AUUUUU
g-hirsutum	..	AACAAG	CUC UCAA	UUAUCU	cu	..	uaUag	Uuuu	..	GaGa	a	UUUG	ugugc	Uugggg	Uucc	Ug	Auga	uuuuuu	AAACCAAG	G	AUUUUU
s-oleracea	..	AACAAG	CUC UCAA	UUAUCU	cu	..	uaUag	Uuuu	..	GaGa	a	UUUG	ugugc	Uugggg	Uucc	Ug	Auga	uuuuuu	AAACCAAG	G	AUUUUU
p-sativum	..	AACAAG	CUC UCAA	UUAUCU	cu	..	uaUag	Uuuu	..	GaGa	a	UUUG	ugugc	Uugggg	Uucc	Ug	Auga	uuuuuu	AAACCAAG	G	AUUUUU
v-faba	ua	UAACAAG	CUC UCAA	UUAUCU	cu	..	uaUag	Uuuu	..	GaGa	a	UUUG	ugugc	Uugggg	Uucc	Ug	Auga	uuuuuu	AAACCAAG	G	AUUUUU
g-max	..	AACAAG	CUC UCAA	UUAUCU	cu	..	uaUag	Uuuu	..	GaGa	a	UUUG	ugugc	Uugggg	Uucc	Ug	Auga	uuuuuu	AAACCAAG	G	AUUUUU
h-vulgare	..	AACAAG	CUC UCAA	UUAUCU	cu	..	uaUag	Uuuu	..	GaGa	a	UUUG	ugugc	Uugggg	Uucc	Ug	Auga	uuuuuu	AAACCAAG	G	AUUUUU
s-cereale	aa	UAACAAG	CUC UCAA	UUAUCU	cu	..	uaUag	Uuuu	..	GaGa	a	UUUG	ugugc	Uugggg	Uucc	Ug	Auga	uuuuuu	AAACCAAG	G	AUUUUU
o-sativa	aa	UAACAAG	CUC UCAA	UUAUCU	cu	..	uaUag	Uuuu	..	GaGa	a	UUUG	ugugc	Uugggg	Uucc	Ug	Auga	uuuuuu	AAACCAAG	G	AUUUUU
z-mays	aa	UAACAAG	CUC UCAA	UUAUCU	cu	..	uaUag	Uuuu	..	GaGa	a	UUUG	ugugc	Uugggg	Uucc	Ug	Auga	uuuuuu	AAACCAAG	G	AUUUUU
Cons. seq.	..	uACAAG	CUC UCAA	UUAUCU	cu	..	uaUag	Uuuu	..	GaGa	a	UUUG	ugugc	Uugggg	Uucc	Ug	Auga	uuuuuu	AAACCAAG	G	AUUUUU
Cons. struct.		aaaaa	bb	ccccccc			ccccccc	bb		aaaaa											
Cons. struct.		(((((	((	(((((	((		(((((	((		(((((	((										

	101	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200					
b-napus	CCAUGACUGCA	AAUUUAGAGAGACG	CSAAAG	CSAAAGCCU	AUGGGUGC	UUCUGUA	ACUGGAU	AACU	AGU	ACUG	AAA	ACCGU	CUU	UAACU	UGGAUG	GUU
s-alba	CCAUGACUGCA	AAUUUAGAGAGACG	CSAAAG	CSAAAGCCU	AUGGGUGC	UUCUGUA	ACUGGAU	AACU	AGU	ACUG	AAA	ACCGU	CUU	UAACU	UGGAUG	GUU
a-thaliana	CCAUGACUGCA	AAUUUAGAGAGACG	CSAAAG	CSAAAGCCU	AUGGGUGC	UUCUGUA	ACUGGAU	AACU	AGU	ACUG	AAA	ACCGU	CUU	UAACU	UGGAUG	GUU
n-debneyi	CCAUGACUGCA	AAUUUAGAGAGACG	CSAAAG	CSAAAGCCU	AUGGGUGC	UUCUGUA	ACUGGAU	AACU	AGU	ACUG	AAA	ACCGU	CUU	UAACU	UGGAUG	GUU
n-plumbagina	CCAUGACUGCA	AAUUUAGAGAGACG	CSAAAG	CSAAAGCCU	AUGGGUGC	UUCUGUA	ACUGGAU	AACU	AGU	ACUG	AAA	ACCGU	CUU	UAACU	UGGAUG	GUU
n-glutinosa	CCAUGACUGCA	AAUUUAGAGAGACG	CSAAAG	CSAAAGCCU	AUGGGUGC	UUCUGUA	ACUGGAU	AACU	AGU	ACUG	AAA	ACCGU	CUU	UAACU	UGGAUG	GUU
n-tabacum	CCAUGACUGCA	AAUUUAGAGAGACG	CSAAAG	CSAAAGCCU	AUGGGUGC	UUCUGUA	ACUGGAU	AACU	AGU	ACUG	AAA	ACCGU	CUU	UAACU	UGGAUG	GUU
s-niger	CCAUGACUGCA	AAUUUAGAGAGACG	CSAAAG	CSAAAGCCU	AUGGGUGC	UUCUGUA	ACUGGAU	AACU	AGU	ACUG	AAA	ACCGU	CUU	UAACU	UGGAUG	GUU
g-hirsutum	CCAUGACUGCA	AAUUUAGAGAGACG	CSAAAG	CSAAAGCCU	AUGGGUGC	UUCUGUA	ACUGGAU	AACU	AGU	ACUG	AAA	ACCGU	CUU	UAACU	UGGAUG	GUU
s-oleracea	CCAUGACUGCA	AAUUUAGAGAGACG	CSAAAG	CSAAAGCCU	AUGGGUGC	UUCUGUA	ACUGGAU	AACU	AGU	ACUG	AAA	ACCGU	CUU	UAACU	UGGAUG	GUU
p-sativum	CCAUGACUGCA	AAUUUAGAGAGACG	CSAAAG	CSAAAGCCU	AUGGGUGC	UUCUGUA	ACUGGAU	AACU	AGU	ACUG	AAA	ACCGU	CUU	UAACU	UGGAUG	GUU
v-faba	CCAUGACUGCA	AAUUUAGAGAGACG	CSAAAG	CSAAAGCCU	AUGGGUGC	UUCUGUA	ACUGGAU	AACU	AGU	ACUG	AAA	ACCGU	CUU	UAACU	UGGAUG	GUU
g-max	CCAUGACUGCA	AAUUUAGAGAGACG	CSAAAG	CSAAAGCCU	AUGGGUGC	UUCUGUA	ACUGGAU	AACU	AGU	ACUG	AAA	ACCGU	CUU	UAACU	UGGAUG	GUU
h-vulgare	CCAUGACUGCA	AAUUUAGAGAGACG	CSAAAG	CSAAAGCCU	AUGGGUGC	UUCUGUA	ACUGGAU	AACU	AGU	ACUG	AAA	ACCGU	CUU	UAACU	UGGAUG	GUU
s-cereale	CCAUGACUGCA	AAUUUAGAGAGACG	CSAAAG	CSAAAGCCU	AUGGGUGC	UUCUGUA	ACUGGAU	AACU	AGU	ACUG	AAA	ACCGU	CUU	UAACU	UGGAUG	GUU
o-sativa	CCAUGACUGCA	AAUUUAGAGAGACG	CSAAAG	CSAAAGCCU	AUGGGUGC	UUCUGUA	ACUGGAU	AACU	AGU	ACUG	AAA	ACCGU	CUU	UAACU	UGGAUG	GUU
z-mays	CCAUGACUGCA	AAUUUAGAGAGACG	CSAAAG	CSAAAGCCU	AUGGGUGC	UUCUGUA	ACUGGAU	AACU	AGU	ACUG	AAA	ACCGU	CUU	UAACU	UGGAUG	GUU
Cons. seq.	CCAUGACUGCA	AAUUUAGAGAGACG	CSAAAG	CSAAAGCCU	AUGGGUGC	UUCUGUA	ACUGGAU	AACU	AGU	ACUG	AAA	ACCGU	CUU	UAACU	UGGAUG	GUU
Cons. struct.				dd	dd				eeeeeeee		))))	))))	))))	))))	))))	))))
Cons. struct.				((	((				(((((		(((((	(((((	(((((	(((((	(((((	(((((

	201	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300													
b-napus	UGGUGU	UUUGAUG	AUCCU	UACCU	UAUUG	ACGCA	AAUUC	Ce	GUU	UUUUA	UUUUA	UCGCa	UUAU	UG	UGCUG	UCCUCC	AGU	AGU	UAU	UGGUA	UUG	UGU	Aa	CCU
s-alba	UGGUGU	UUUGAUG	AUCCU	UACCU	UAUUG	ACGCA	AAUUC	Ce	GUU	UUUUA	UUUUA	UCGCa	UUAU	UG	UGCUG	UCCUCC	AGU	AGU	UAU	UGGUA	UUG	UGU	Aa	CCU
a-thaliana	UGGUGU	UUUGAUG	AUCCU	UACCU	UAUUG	ACGCA	AAUUC	Ce	GUU	UUUUA	UUUUA	UCGCa	UUAU	UG	UGCUG	UCCUCC	AGU	AGU	UAU	UGGUA	UUG	UGU	Aa	CCU
n-debneyi	UGGUGU	UUUGAUG	AUCCU	UACCU	UAUUG	ACGCA	AAUUC	Ce	GUU	UUUUA	UUUUA	UCGCa	UUAU	UG	UGCUG	UCCUCC	AGU	AGU	UAU	UGGUA	UUG	UGU	Aa	CCU
n-plumbagina	UGGUGU	UUUGAUG	AUCCU	UACCU	UAUUG	ACGCA	AAUUC	Ce	GUU	UUUUA	UUUUA	UCGCa	UUAU	UG	UGCUG	UCCUCC	AGU	AGU	UAU	UGGUA	UUG	UGU	Aa	CCU
n-glutinosa	UGGUGU	UUUGAUG	AUCCU	UACCU	UAUUG	ACGCA	AAUUC	Ce	GUU	UUUUA	UUUUA	UCGCa	UUAU	UG	UGCUG	UCCUCC	AGU	AGU	UAU	UGGUA	UUG	UGU	Aa	CCU
n-tabacum	UGGUGU	UUUGAUG	AUCCU	UACCU	UAUUG	ACGCA	AAUUC	Ce	GUU	UUUUA	UUUUA	UCGCa	UUAU	UG	UGCUG	UCCUCC	AGU	AGU	UAU	UGGUA	UUG	UGU	Aa	CCU
s-niger	UGGUGU	UUUGAUG	AUCCU	UACCU	UAUUG	ACGCA	AAUUC	Ce	GUU	UUUUA	UUUUA	UCGCa	UUAU	UG	UGCUG	UCCUCC	AGU	AGU	UAU	UGGUA	UUG	UGU	Aa	CCU
g-hirsutum	UGGUGU	UUUGAUG	AUCCU	UACCU	UAUUG	ACGCA	AAUUC	Ce	GUU	UUUUA	UUUUA	UCGCa	UUAU	UG	UGCUG	UCCUCC	AGU	AGU	UAU	UGGUA	UUG	UGU	Aa	CCU
s-oleracea	UGGUGU	UUUGAUG	AUCCU	UACCU	UAUUG	ACGCA	AAUUC	Ce	GUU	UUUUA	UUUUA	UCGCa	UUAU	UG	UGCUG	UCCUCC	AGU	AGU	UAU	UGGUA	UUG	UGU	Aa	CCU
p-sativum	UGGUGU	UUUGAUG	AUCCU	UACCU	UAUUG	ACGCA	AAUUC	Ce	GUU	UUUUA	UUUUA	UCGCa	UUAU	UG	UGCUG	UCCUCC	AGU	AGU	UAU	UGGUA	UUG	UGU	Aa	CCU
v-faba	UGGUGU	UUUGAUG	AUCCU	UACCU	UAUUG	ACGCA	AAUUC	Ce	GUU	UUUUA	UUUUA	UCGCa	UUAU	UG	UGCUG	UCCUCC	AGU	AGU	UAU	UGGUA	UUG	UGU	Aa	CCU
g-max	UGGUGU	UUUGAUG	AUCCU	UACCU	UAUUG	ACGCA	AAUUC	Ce	GUU	UUUUA	UUUUA	UCGCa	UUAU	UG	UGCUG	UCCUCC	AGU	AGU	UAU	UGGUA	UUG	UGU	Aa	CCU
h-vulgare	UGGUGU	UUUGAUG	AUCCU	UACCU	UAUUG	ACGCA	AAUUC	Ce	GUU	UUUUA	UUUUA	UCGCa	UUAU	UG	UGCUG	UCCUCC	AGU	AGU	UAU	UGGUA	UUG	UGU	Aa	CCU
s-cereale	UGGUGU	UUUGAUG	AUCCU	UACCU	UAUUG	ACGCA	AAUUC	Ce	GUU	UUUUA	UUUUA	UCGCa	UUAU	UG	UGCUG	UCCUCC	AGU	AGU	UAU	UGGUA	UUG	UGU	Aa	CCU
o-sativa	UGGUGU	UUUGAUG	AUCCU	UACCU	UAUUG	ACGCA	AAUUC	Ce	GUU	UUUUA	UUUUA	UCGCa	UUAU	UG	UGCUG	UCCUCC	AGU	AGU	UAU	UGGUA	UUG	UGU	Aa	CCU
z-mays	UGGUGU	UUUGAUG	AUCCU	UACCU	UAUUG	ACGCA	AAUUC	Ce	GUU	UUUUA	UUUUA	UCGCa	UUAU	UG	UGCUG	UCCUCC	AGU	AGU	UAU	UGGUA	UUG	UGU	Aa	CCU
Cons. seq.	UGGUGU	UUUGAUG	AUCCU	UACCU	UAUUG	ACGCA	AAUUC	Ce	GUU	UUUUA	UUUUA	UCGCa	UUAU	UG	UGCUG	UCCUCC	AGU	AGU	UAU	UGGUA	UUG	UGU	Aa	CCU
Cons. struct.		eeeeeee							99999		hhhhh													
Cons. struct.		(((((	((	((	((	((	((	((	(((((		(((((	((	((	((	((	((	((	((	((	((	((	((	((	

	301	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400											
b-napus	GUUUCUG	GAUCUCU	CUUUA	CGSAAACA	AUAUUAUU	CGGUGCA	AUAU	AUUC	CUACU	UCUGCa	GCUA	UAU	GGU	UUG	CAU	UUUUU	CCG	g	AUCU	GGG	AAG	CUG
s-alba	GUUUCUG	GAUCUCU	CUUUA	CGSAAACA	AUAUUAUU	CGGUGCA	AUAU	AUUC	CUACU	UCUGCa	GCUA	UAU	GGU	UUG	CAU	UUUUU	CCG	g	AUCU	GGG	AAG	CUG
a-thaliana	GUUUCUG	GAUCUCU	CUUUA	CGSAAACA	AUAUUAUU	CGGUGCA	AUAU	AUUC	CUACU	UCUGCa	GCUA	UAU	GGU	UUG	CAU	UUUUU	CCG	g	AUCU	GGG	AAG	CUG
n-debneyi	GUUUCUG	GAUCUCU	CUUUA	CGSAAACA	AUAUUAUU	CGGUGCA	AUAU	AUUC	CUACU	UCUGCa	GCUA	UAU	GGU	UUG	CAU	UUUUU	CCG	g	AUCU	GGG	AAG	CUG
n-plumbagina	GUUUCUG	GAUCUCU	CUUUA	CGSAAACA	AUAUUAUU	CGGUGCA	AUAU	AUUC	CUACU	UCUGCa	GCUA	UAU	GGU	UUG	CAU	UUUUU	CCG	g	AUCU	GGG	AAG	CUG
n-glutinosa	GUUUCUG	GAUCUCU	CUUUA	CGSAAACA	AUAUUAUU	CGGUGCA	AUAU	AUUC	CUACU	UCUGCa	GCUA	UAU	GGU	UUG	CAU	UUUUU	CCG	g	AUCU	GGG	AAG	CUG
n-tabacum	GUUUCUG	GAUCUCU	CUUUA	CGSAAACA	AUAUUAUU	CGGUGCA	AUAU	AUUC	CUACU	UCUGCa	GCUA	UAU	GGU	UUG	CAU	UUUUU	CCG	g	AUCU	GGG	AAG	CUG
s-niger	GUUUCUG	GAUCUCU	CUUUA	CGSAAACA	AUAUUAUU	CGGUGCA	AUAU	AUUC	CUACU	UCUGCa	GCUA	UAU	GGU	UUG	CAU	UUUUU	CCG	g	AUCU	GGG	AAG	CUG
g-hirsutum	GUUUCUG	GAUCUCU	CUUUA	CGSAAACA	AUAUUAUU	CGGUGCA	AUAU	AUUC	CUACU	UCUGCa	GCUA	UAU	GGU	UUG	CAU	UUUUU	CCG	g	AUCU	GGG	AAG	CUG
s-oleracea	GUUUCUG	GAUCUCU	CUUUA	CGSAAACA	AUAUUAUU	CGGUGCA	AUAU	AUUC	CUACU	UCUGCa	GCUA	UAU	GGU	UUG	CAU	UUUUU	CCG	g	AUCU	GGG	AAG	CUG
p-sativum	GUUUCUG	GAUCUCU	CUUUA	CGSAAACA	AUAUUAUU	CGGUGCA	AUAU	AUUC	CUACU	UCUGCa	GCUA	UAU	GGU	UUG	CAU	UUUUU	CCG	g	AUCU	GGG	AAG	CUG
v-faba	GUUUCUG	GAUCUCU	CUUUA	CGSAAACA	AUAUUAUU																	



***psbA*-mRNA: Struktur-optimiertes Alignment, Teil 2**



Cons. seq. a . aAAa . aAAAgGAGCAUAUa CCAc UuUCUUGuu . . A . CAAGAu . GUGGaUAUUu CUCc UUUuUUUUUU .
Cons. struct. 
Cons. struct. 

psbA-mRNA: Struktur-optimiertes Alignment, Teil 4

121

	301	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400	
c-reflexa	AAGCUGGUGU	UAAAGACU	AACUAAUUGACG	CUUUAUUAU	CUCGCGAU	UAUAGAACCA	AGGAUC	AGUCGUAU	AUUCUGG	CAGCAUUCG	AGUAC	ACUCCUGCAACCGCG
i-purpurea	AAGCUGGUGU	UAAAGACU	AACUAAUUGACG	CUUUAUUAU	CUCGCGAU	UAUAGAACCA	AGGAUC	AGUCGUAU	AUUCUGG	CAGCAUUCG	AGUAC	ACUCCUGCAACCGCG
n-acuminata	AAGCUGGUGU	UAAAGACU	AACUAAUUGACG	CUUUAUUAU	CUCGCGAU	UAUAGAACCA	AGGAUC	AGUCGUAU	AUUCUGG	CAGCAUUCG	AGUAC	ACUCCUGCAACCGCG
n-otophora	AAGCUGGUGU	UAAAGACU	AACUAAUUGACG	CUUUAUUAU	CUCGCGAU	UAUAGAACCA	AGGAUC	AGUCGUAU	AUUCUGG	CAGCAUUCG	AGUAC	ACUCCUGCAACCGCG
n-abacum	AAGCUGGUGU	UAAAGACU	AACUAAUUGACG	CUUUAUUAU	CUCGCGAU	UAUAGAACCA	AGGAUC	AGUCGUAU	AUUCUGG	CAGCAUUCG	AGUAC	ACUCCUGCAACCGCG
p-hybrida	AAGCUGGUGU	UAAAGACU	AACUAAUUGACG	CUUUAUUAU	CUCGCGAU	UAUAGAACCA	AGGAUC	AGUCGUAU	AUUCUGG	CAGCAUUCG	AGUAC	ACUCCUGCAACCGCG
o-corymbosa	AAGCgGUGU	UAAAGACU	AACUAAUUGACG	CUUUAUUAU	CUCGCGAU	UAUAGAACCA	AGGAUC	AGUCGUAU	AUUCUGG	CAGCAUUCG	AGUAC	ACUCCUGCAACCGCG
f-fringile	AAGCUGGUGU	UAAAGACU	AACUAAUUGACG	CUUUAUUAU	CUCGCGAU	UAUAGAACCA	AGGAUC	AGUCGUAU	AUUCUGG	CAGCAUUCG	AGUAC	ACUCCUGCAACCGCG
a-rosea	AAGCUGGUGU	UAAAGACU	AACUAAUUGACG	CUUUAUUAU	CUCGCGAU	UAUAGAACCA	AGGAUC	AGUCGUAU	AUUCUGG	CAGCAUUCG	AGUAC	ACUCCUGCAACCGCG
s-oleracea	AAGCUGGUGU	UAAAGACU	AACUAAUUGACG	CUUUAUUAU	CUCGCGAU	UAUAGAACCA	AGGAUC	AGUCGUAU	AUUCUGG	CAGCAUUCG	AGUAC	ACUCCUGCAACCGCG
b-alba	AAGCaGGUGU	UAAAGACU	AACUAAUUGACG	CUUUAUUAU	CUCGCGAU	UAUAGAACCA	AGGAUC	AGUCGUAU	AUUCUGG	CAGCAUUCG	AGUAC	ACUCCUGCAACCGCG
g-pharnaci	AAGCUGGUGU	UAAAGACU	AACUAAUUGACG	CUUUAUUAU	CUCGCGAU	UAUAGAACCA	AGGAUC	AGUCGUAU	AUUCUGG	CAGCAUUCG	AGUAC	ACUCCUGCAACCGCG
g-hirsutum	AAGCUGGUGU	UAAAGACU	AACUAAUUGACG	CUUUAUUAU	CUCGCGAU	UAUAGAACCA	AGGAUC	AGUCGUAU	AUUCUGG	CAGCAUUCG	AGUAC	ACUCCUGCAACCGCG
p-deltoides	AgGcUGGUGU	UAAAGACU	AACUAAUUGACG	CUUUAUUAU	CUCGCGAU	UAUAGAACCA	AGGAUC	AGUCGUAU	AUUCUGG	CAGCAUUCG	AGUAC	ACUCCUGCAACCGCG
a-thaliana	AAGCUGGUGU	UAAAGACU	AACUAAUUGACG	CUUUAUUAU	CUCGCGAU	UAUAGAACCA	AGGAUC	AGUCGUAU	AUUCUGG	CAGCAUUCG	AGUAC	ACUCCUGCAACCGCG
n-munroi	AAGCUGGUGU	UAAAGACU	AACUAAUUGACG	CUUUAUUAU	CUCGCGAU	UAUAGAACCA	AGGAUC	AGUCGUAU	AUUCUGG	CAGCAUUCG	AGUAC	ACUCCUGCAACCGCG
n-tenuifoli	AAGCUGGUGU	UAAAGACU	AACUAAUUGACG	CUUUAUUAU	CUCGCGAU	UAUAGAACCA	AGGAUC	AGUCGUAU	AUUCUGG	CAGCAUUCG	AGUAC	ACUCCUGCAACCGCG
s-italica	AAGCUGGUGU	UAAAGACU	AACUAAUUGACG	CUUUAUUAU	CUCGCGAU	UAUAGAACCA	AGGAUC	AGUCGUAU	AUUCUGG	CAGCAUUCG	AGUAC	ACUCCUGCAACCGCG
z-mayensis	AAGCUGGUGU	UAAAGACU	AACUAAUUGACG	CUUUAUUAU	CUCGCGAU	UAUAGAACCA	AGGAUC	AGUCGUAU	AUUCUGG	CAGCAUUCG	AGUAC	ACUCCUGCAACCGCG
o-sativa	AAGCUGGUGU	UAAAGACU	AACUAAUUGACG	CUUUAUUAU	CUCGCGAU	UAUAGAACCA	AGGAUC	AGUCGUAU	AUUCUGG	CAGCAUUCG	AGUAC	ACUCCUGCAACCGCG
h-vulgaris	AAGCUGGUGU	UAAAGACU	AACUAAUUGACG	CUUUAUUAU	CUCGCGAU	UAUAGAACCA	AGGAUC	AGUCGUAU	AUUCUGG	CAGCAUUCG	AGUAC	ACUCCUGCAACCGCG
Cons. seq.	AAGCUGGUGU	UAAAGACU	AACUAAUUGACG	CUUUAUUAU	CUCGCGAU	UAUAGAACCA	AGGAUC	AGUCGUAU	AUUCUGG	CAGCAUUCG	AGUAC	ACUCCUGCAACCGCG
Cons. struct.							eeee	eeee		ffff	ff	
Cons. struct.							(((((	))))		(((((	)))	

rbcL-mRNA: unverändertes Alignment, Teil 1

[illegible]

[illegible]

d-aida	GCAGGCGUCGCAAAUGGAGUCCUGAACUAGCGGCUUGUGAGUAUGGAAGGAAAGCAAUUUGA	GUUCCAG	CAGUGGAUACUUUGGAU	
g-pharnaci	GCAGGCGUaGCAAUGGAGUCCUGAACUAGCGGCUUGUGAGUAUGGAAGGcGAUCAAUUUGA	aUUCCgG	CAGUGGAUaUUUGGAU	
g-hirsutum	GCAGGCGUaGCAAUGGAGUCCUGAACUAGCGGCUUGUGAGUAUGGAAGGcGAUCAAUUUGA	aUUCgAAG	CaaUGGAUACUUUG	
p-deltoides	GuGaAGCUaGCAAUGGAGcCCUGAACUAGCGGCUUGUGAGUAUGGAAGGAGAUCAAUUUGA	aUUCCAAG	CaaUGGAUACgUUG	
a-thaliana	GuGaAGCUUGCAAUGGAGUCCUGAACUAGCGGCUUGUGAGUAUGGAAGAAAGAGAUCAUUUaA	cUUCcAa	CcaUcGAUAAaUUaGAU	
n-munroi	aaGc aGCUUGCAAUGGAGUCCUGAACUAGCcCcaGCUUGUGAGUAUGGAAGGcGAUCAAUUUGA	GUUCgAgc	CgGUUGAUACgUaGAUaaggu	
n-tenuifoli	aaGc aGCUUGCAAUGGAGUCCUGAACUAGCcCcaGCUUGUGAGUAUGGAAGGcGAUCAAUUUGA	GUUCgAgc	CgGUUGAUACgUaGAUaaggu	
s-italica	aaGc aGCUUGCAAUGGAGUCCUGAACUAGCcCcaGCUUGUGAGUAUGGAAGGAGUACAAUUUGA	AgGUUCgAaAg	CgaUGGAUACcUa	
z-mays	aaGc aGCUUGCAAUGGAGUgCcGAACUAGCcCcaGCUUGcGAaUAUGGAAGGAGUACAAUUcG	AgGUUuCAaAg	CgaUGGAUACaUa	
o-sativa	GaucaGCUUGCAAUGGAGUCCUGAACUAGCcCcaGCUUGUGAaUAUGGAAGcGAUCAAUUUGA	GUUCgAgc	CgGUaGAUAAcUaGAUagcua	
h-vulgare				
Cons. seq.	GcGAGGCUuGCAAUGGAGUCCUGAACUAGCGGCUUGUGAGUAUGGAAGGAGUACAAUUUGA	gUUCcAAG	CagUGGAUACuUgGAU	
Cons. struct.		QQ	QQ	
		((	))	
c-reflexa	1701	1710	1720	1730
i-purpurea	1740	1750	1760	1770
n-acuminata	1780	1790	1800	
n-otophora				
n-tabacum				
p-hybrida				
o-corymbosa				
f-pringlei				
a-rosea				
s-oleracea				
b-alba				
g-pharnaci				
g-hirsutum				
p-deltoides				
a-thaliana				
n-munroi				
n-tenuifoli				
s-italica				
z-mays				
o-sativa				
h-vulgare				
Cons. seq.				
Cons. struct.				
c-reflexa	1801	1810	1820	1830
i-purpurea	1840	1850	1860	1870
n-acuminata	1880	1890	1900	
n-otophora				
n-tabacum				
p-hybrida				
o-corymbosa				
f-pringlei				
a-rosea				
s-oleracea				
b-alba				
g-pharnaci				
g-hirsutum				
p-deltoides				
a-thaliana				
n-munroi				
n-tenuifoli				
s-italica				
z-mays				
o-sativa				
h-vulgare				
Cons. seq.				
Cons. struct.				

Project: rbcL_Alignment_1; Date: Mar 14, 2000 22:26

[illegible]

	401	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
c-reflexa	AGUUCGCG	UAGAAG	CGGGGCG	CGGUAGCG	CGGAUUCU	UUCUACUG	..	GUACAUGG	ACAAUGU	UGGACCGA	UGGACCUU
i-purpurea	AGUUCGCG	UAGAAG	CAGGGGCG	CGGUAGCG	CGGAUUCU	UUCUACUG	..	GUACAUGG	ACAAUGU	UGGACCGA	UGGACCUU
n-acuminata	AGUUCGa	CUGAAGA	CAGGGGCG	CGGUAGCG	CGGAUUCU	UUCUACUG	..	GUACAUGG	ACAAUGU	UGGACCGA	UGGACCUU
n-otophora	AGUUCGa	CUGAAGA	CAGGGGCG	CGGUAGCG	CGGAUUCU	UUCUACUG	..	GUACAUGG	ACAAUGU	UGGACCGA	UGGACCUU
n-tabacum	AGUUCGa	CUGAAGA	CAGGGGCG	CGGUAGCG	CGGAUUCU	UUCUACUG	..	GUACAUGG	ACAAUGU	UGGACCGA	UGGACCUU
p-hybrida	AGUUCGa	CUGAAGA	CAGGGGCG	CGGUAGCG	CGGAUUCU	UUCUACUG	..	GUACAUGG	ACAAUGU	UGGACCGA	UGGACCUU
o-corymbosa	AGUUCGCG	UAGAAG	CAGGGGCG	CGGUAGCG	CGGAUUCU	UUCUACUG	..	GUACAUGG	ACAAUGU	UGGACCGA	UGGACCUU
f-pringlei	AGUUCGCG	UAGAAG	CAGGGGCG	CGGUAGCG	CGGAUUCU	UUCUACUG	..	GUACAUGG	ACAAUGU	UGGACCGA	UGGACCUU
a-rosea	AGUUCGa	CUGAAGA	CAGGGGCG	CGGUAGCG	CGGAUUCU	UUCUACUG	..	GUACAUGG	ACAAUGU	UGGACCGA	UGGACCUU
s-oleracea	AGUUCGa	CUGAAGA	CAGGGGCG	CGGUAGCG	CGGAUUCU	UUCUACUG	..	GUACAUGG	ACAAUGU	UGGACCGA	UGGACCUU
b-alba	AGUUCGCG	UAGAAG	CAGGGGCG	CGGUAGCG	CGGAUUCU	UUCUACUG	..	GUACAUGG	ACAAUGU	UGGACCGA	UGGACCUU
g-pharnaci	AGUUCGa	CUGAAGA	CAGGGGCG	CGGUAGCG	CGGAUUCU	UUCUACUG	..	GUACAUGG	ACAAUGU	UGGACCGA	UGGACCUU
g-hirsutum	AGUUCGCG	UAGAAG	CAGGGGCG	CGGUAGCG	CGGAUUCU	UUCUACUG	..	GUACAUGG	ACAAUGU	UGGACCGA	UGGACCUU
p-deltoides	AGUUCGCG	UAGAAG	CAGGGGCG	CGGUAGCG	CGGAUUCU	UUCUACUG	..	GUACAUGG	ACAAUGU	UGGACCGA	UGGACCUU
a-thaliana	AGUUCGa	CUGAAGA	CAGGGGCG	CGGUAGCG	CGGAUUCU	UUCUACUG	..	GUACAUGG	ACAAUGU	UGGACCGA	UGGACCUU
n-munroi	gUUCGCG	UAGAAG	CAGGGGCG	CGGUAGCG	CGGAUUCU	UUCUACUG	..	GUACAUGG	ACAAUGU	UGGACCGA	UGGACCUU
n-tenuifoli	gUUCGCG	UAGAAG	CAGGGGCG	CGGUAGCG	CGGAUUCU	UUCUACUG	..	GUACAUGG	ACAAUGU	UGGACCGA	UGGACCUU
s-italica	gUUCGCG	UAGAAG	CAGGGGCG	CGGUAGCG	CGGAUUCU	UUCUACUG	..	GUACAUGG	ACAAUGU	UGGACCGA	UGGACCUU
z-mays	gUUCGCG	UAGAAG	CAGGGGCG	CGGUAGCG	CGGAUUCU	UUCUACUG	..	GUACAUGG	ACAAUGU	UGGACCGA	UGGACCUU
o-sativa	gUUCGCG	UAGAAG	CAGGGGCG	CGGUAGCG	CGGAUUCU	UUCUACUG	..	GUACAUGG	ACAAUGU	UGGACCGA	UGGACCUU
h-vulgare	gUUCGCG	UAGAAG	CAGGGGCG	CGGUAGCG	CGGAUUCU	UUCUACUG	..	GUACAUGG	ACAAUGU	UGGACCGA	UGGACCUU
Cons. seq.	AGUUCGCG	UAGAAG	CAGGGGCG	CGGUAGCG	CGGAUUCU	UUCUACUG	..	GUACAUGG	ACAAUGU	UGGACCGA	UGGACCUU
Cons. struct.	ggggg	hhhh	hhhh	hhhh	iiii	iiii	jjjjj	jjjjj	kkkk	kkkk	ii
Cons. struct.	))))	(((((	))))	))))	(((((	(((((	(((((	(((((	(((((	(((((	(((((
	501	510	520	530	540	550	560	570	580	590	600
c-reflexa	UACAAGGg	CGAUGCUACG	CAUUGAGCG	CGUUAU	UGGAGA	Aa	AAGAUCA	AUAUAU	UGc	UUAUGU	cGCUUACCCu
i-purpurea	UACAAGGg	CGAUGCUACG	CAUUGAGCG	CGUUAU	UGGAGA	Aa	AAGAUCA	AUAUAU	UGc	UUAUGU	cGCUUACCCu
n-acuminata	UACAAGGg	CGAUGCUACG	CAUUGAGCG	CGUUAU	UGGAGA	Aa	AAGAUCA	AUAUAU	UGc	UUAUGU	cGCUUACCCu
n-otophora	UACAAGGg	CGAUGCUACG	CAUUGAGCG	CGUUAU	UGGAGA	Aa	AAGAUCA	AUAUAU	UGc	UUAUGU	cGCUUACCCu
n-tabacum	UACAAGGg	CGAUGCUACG	CAUUGAGCG	CGUUAU	UGGAGA	Aa	AAGAUCA	AUAUAU	UGc	UUAUGU	cGCUUACCCu
p-hybrida	UACAAGGg	CGAUGCUACG	CAUUGAGCG	CGUUAU	UGGAGA	Aa	AAGAUCA	AUAUAU	UGc	UUAUGU	cGCUUACCCu
o-corymbosa	UACAAGGg	CGAUGCUACG	CAUUGAGCG	CGUUAU	UGGAGA	Aa	AAGAUCA	AUAUAU	UGc	UUAUGU	cGCUUACCCu
f-pringlei	UACAAGGg	CGAUGCUACG	CAUUGAGCG	CGUUAU	UGGAGA	Aa	AAGAUCA	AUAUAU	UGc	UUAUGU	cGCUUACCCu
a-rosea	UACAAGGg	CGAUGCUACG	CAUUGAGCG	CGUUAU	UGGAGA	Aa	AAGAUCA	AUAUAU	UGc	UUAUGU	cGCUUACCCu
s-oleracea	UACAAGGg	CGAUGCUACG	CAUUGAGCG	CGUUAU	UGGAGA	Aa	AAGAUCA	AUAUAU	UGc	UUAUGU	cGCUUACCCu
b-alba	UACAAGGg	CGAUGCUACG	CAUUGAGCG	CGUUAU	UGGAGA	Aa	AAGAUCA	AUAUAU	UGc	UUAUGU	cGCUUACCCu
g-pharnaci	UACAAGGg	CGAUGCUACG	CAUUGAGCG	CGUUAU	UGGAGA	Aa	AAGAUCA	AUAUAU	UGc	UUAUGU	cGCUUACCCu
g-hirsutum	UACAAGGg	CGAUGCUACG	CAUUGAGCG	CGUUAU	UGGAGA	Aa	AAGAUCA	AUAUAU	UGc	UUAUGU	cGCUUACCCu
p-deltoides	UACAAGGg	CGAUGCUACG	CAUUGAGCG	CGUUAU	UGGAGA	Aa	AAGAUCA	AUAUAU	UGc	UUAUGU	cGCUUACCCu
a-thaliana	UACAAGGg	CGAUGCUACG	CAUUGAGCG	CGUUAU	UGGAGA	Aa	AAGAUCA	AUAUAU	UGc	UUAUGU	cGCUUACCCu
n-munroi	UACAAGGg	CGAUGCUACG	CAUUGAGCG	CGUUAU	UGGAGA	Aa	AAGAUCA	AUAUAU	UGc	UUAUGU	cGCUUACCCu
n-tenuifoli	UACAAGGg	CGAUGCUACG	CAUUGAGCG	CGUUAU	UGGAGA	Aa	AAGAUCA	AUAUAU	UGc	UUAUGU	cGCUUACCCu
s-italica	UACAAGGg	CGAUGCUACG	CAUUGAGCG	CGUUAU	UGGAGA	Aa	AAGAUCA	AUAUAU	UGc	UUAUGU	cGCUUACCCu
z-mays	UACAAGGg	CGAUGCUACG	CAUUGAGCG	CGUUAU	UGGAGA	Aa	AAGAUCA	AUAUAU	UGc	UUAUGU	cGCUUACCCu
o-sativa	UACAAGGg	CGAUGCUACG	CAUUGAGCG	CGUUAU	UGGAGA	Aa	AAGAUCA	AUAUAU	UGc	UUAUGU	cGCUUACCCu
h-vulgare	UACAAGGg	CGAUGCUACG	CAUUGAGCG	CGUUAU	UGGAGA	Aa	AAGAUCA	AUAUAU	UGc	UUAUGU	cGCUUACCCu
Cons. seq.	UACAAGGg	CGAUGCUACG	CAUUGAGCG	CGUUAU	UGGAGA	Aa	AAGAUCA	AUAUAU	UGc	UUAUGU	cGCUUACCCu
Cons. struct.	))))	(((((	))))	))))	(((((	(((((	(((((	(((((	(((((	(((((	(((((
	601	610	620	630	640	650	660	670	680	690	700
c-reflexa	UUAACAA	CGUUAU	UUAUCCAU	UGGUA	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU
i-purpurea	UUAACAA	CGUUAU	UUAUCCAU	UGGUA	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU
n-acuminata	UUAACAA	CGUUAU	UUAUCCAU	UGGUA	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU
n-otophora	UUAACAA	CGUUAU	UUAUCCAU	UGGUA	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU
n-tabacum	UUAACAA	CGUUAU	UUAUCCAU	UGGUA	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU
p-hybrida	UUAACAA	CGUUAU	UUAUCCAU	UGGUA	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU
o-corymbosa	UUAACAA	CGUUAU	UUAUCCAU	UGGUA	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU
f-pringlei	UUAACAA	CGUUAU	UUAUCCAU	UGGUA	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU
a-rosea	UUAACAA	CGUUAU	UUAUCCAU	UGGUA	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU
s-oleracea	UUAACAA	CGUUAU	UUAUCCAU	UGGUA	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU
b-alba	UUAACAA	CGUUAU	UUAUCCAU	UGGUA	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU
g-pharnaci	UUAACAA	CGUUAU	UUAUCCAU	UGGUA	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU
g-hirsutum	UUAACAA	CGUUAU	UUAUCCAU	UGGUA	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU
p-deltoides	UUAACAA	CGUUAU	UUAUCCAU	UGGUA	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU
a-thaliana	UUAACAA	CGUUAU	UUAUCCAU	UGGUA	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU
n-munroi	UUAACAA	CGUUAU	UUAUCCAU	UGGUA	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU
n-tenuifoli	UUAACAA	CGUUAU	UUAUCCAU	UGGUA	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU
s-italica	UUAACAA	CGUUAU	UUAUCCAU	UGGUA	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU
z-mays	UUAACAA	CGUUAU	UUAUCCAU	UGGUA	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU
o-sativa	UUAACAA	CGUUAU	UUAUCCAU	UGGUA	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU
h-vulgare	UUAACAA	CGUUAU	UUAUCCAU	UGGUA	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU
Cons. seq.	UUAACAA	CGUUAU	UUAUCCAU	UGGUA	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU	UGGUAU
Cons. struct.	))))	(((((	))))	))))	(((((	(((((	(((((	(((((	(((((	(((((	(((((
	701	710	720	730	740	750	760	770	780	790	800
c-reflexa	AACUUAU	CAAGGCG	CGCUCAC	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU
i-purpurea	AACUUAU	CAAGGCG	CGCUCAC	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU
n-acuminata	AACUUAU	CAAGGCG	CGCUCAC	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU
n-otophora	AACUUAU	CAAGGCG	CGCUCAC	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU
n-tabacum	AACUUAU	CAAGGCG	CGCUCAC	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU
p-hybrida	AACUUAU	CAAGGCG	CGCUCAC	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU
o-corymbosa	AACUUAU	CAAGGCG	CGCUCAC	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU
f-pringlei	AACUUAU	CAAGGCG	CGCUCAC	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU
a-rosea	AACUUAU	CAAGGCG	CGCUCAC	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU
s-oleracea	AACUUAU	CAAGGCG	CGCUCAC	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU
b-alba	AACUUAU	CAAGGCG	CGCUCAC	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU
g-pharnaci	AACUUAU	CAAGGCG	CGCUCAC	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU
g-hirsutum	AACUUAU	CAAGGCG	CGCUCAC	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU
p-deltoides	AACUUAU	CAAGGCG	CGCUCAC	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU
a-thaliana	AACUUAU	CAAGGCG	CGCUCAC	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU
n-munroi	AACUUAU	CAAGGCG	CGCUCAC	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU
n-tenuifoli	AACUUAU	CAAGGCG	CGCUCAC	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU
s-italica	AACUUAU	CAAGGCG	CGCUCAC	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU
z-mays	AACUUAU	CAAGGCG	CGCUCAC	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU
o-sativa	AACUUAU	CAAGGCG	CGCUCAC	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU
h-vulgare	AACUUAU	CAAGGCG	CGCUCAC	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU
Cons. seq.	AACUUAU	CAAGGCG	CGCUCAC	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU	CGGUAU
Cons. struct.	))))	(((((	))))	))))	(((((	(((((	(((((	(((((	(((((	(((((	(((((
	801	810	820	830	840	850	860	870	880	890	900
c-reflexa	GUUAUCG	GUUAUAA	AAACUAG	AGCGGU	GUUAUAA	AAACUAG	AGCGGU	GUUAUAA	AAACUAG	AGCGGU	GUUAUAA
i-purpurea	GUUAUCG	GUUAUAA	AAACUAG	AGCGGU	GUUAUAA	AAACUAG	AGCGGU	GUUAUAA	AAACUAG	AGCGGU	GUUAUAA
n-acuminata	GUUAUCG	GUUAUAA	AAACUAG	AGCGGU	GUUAUAA	AAACUAG	AGCGGU	GUUAUAA	AAACUAG	AGCGGU	GUUAUAA

[illegible]

[illegible]

[illegible]

Kapitel 8

Abkürzungen

A	Adenosin
A_n	Absorption bei Wellenlänge n nm
Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
<i>atpB</i>	Gen der β -Untereinheit der ATPase
<i>atpE</i>	Gen der ε -Untereinheit der ATPase
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytidin
Ci	Curie
cpm	counts per minute
CTP	Cytidintriphosphat
d	Tage
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphate
ds	Doppelstrang-, doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat

G	Guanosin
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
IVT	<i>in vitro</i> -Transkript
K	Gleichgewichtskonstante
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
M	molar ($\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)
mA	Milliampere
min	Minute
mRNA	Messenger-RNA
nt	Nukleotide
NTP	Ribonukleotidtriphosphate
PAA	Polyacrylamid
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
<i>psaA</i>	Gen des Chlorophyll-a-Apoproteins A1
<i>psaB</i>	Gen des Chlorophyll-a-Apoproteins A2
<i>psbA</i>	Gen des D1-Proteins im Photosystem II
<i>rbcL</i>	Gen der großen Untereinheit der RubisCO
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
<i>rpl14</i>	Gen des ribosomalen Proteins L14
rpm	revolutions per minute
rRNA	ribosomale RNA
RubisCO	Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxidase
S	Svedberg-Einheit
s	Sekunde
ss	Einzelstrang-, einzelsträngig

TEMED	N,N,N',N'-Teramethylethyldiamin
TGGE	Temperaturgradienten-Gelelektrophorese
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
U	Uridin
u	unit (Einheit der Enzymaktivität)
UTP	Uridintriphosphat
UV	Ultraviolett
V	Volt
W	Watt
α	Antisense- (bei RNA/DNA)
ΔG	Freie Energie

Literaturverzeichnis

- [1] Adams CC & Stern DB (1990)
Control of mRNA stability in chloroplasts by 3' inverted repeats: Effects of stem and loop mutations on degradation of *psbA* mRNA *in vitro*.
Nucleic Acids Res **18**, 6003-6010.
- [2] Alexander C, Faber N & Klaff P (1998)
Characterization of protein binding to the spinach chloroplast *psbA* mRNA 5' untranslated region
Nucleic Acids Res **18**, 6003-6010
- [3] Arnon DI (1949)
Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*
Plant Phys **24**, 1-13
- [4] Atwater JA, Wisdom R & Verma IM (1990)
Regulated mRNA stability
Ann Rev Genet **24**, 519-541
- [5] Baginsky S, Tiller K & Link G
Transcription factor phosphorylation by a protein kinase associated with chloroplast RNA polymerase from mustard (*Sinapis alba*)
Plant Mol Biol **34**, 181-189
- [6] Barber J (1976)
Ionic regulation in intact chloroplasts and its effect on primary photosynthetic processes. In Barber J (Hrsg.) *The intact chloroplast*. Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, New York, Oxford, Bd. 1, S. 89-134.
- [7] 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

- [8] Barkan A (1993)
Nuclear mutants of maize with defects in chloroplast polysome assembly have altered chloroplast RNA metabolism.
Plant Cell **5**, 389-402
- [9] Barkan A., Walker M, Nolasco M, und 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
- [10] Belasco J. (1993)
mRNA Degradation in Prokaryotic Cells: An Overview
in *Control of Messenger RNA Stability*, S. 3-12, Acad. Press, Orlando/Florida
- [11] Blum E, Carpousis AJ & Higgins CF (1999)
Polyadenylation promotes degradation of 3'-structured RNA by the Escherichia coli mRNA degradosome *in vitro*
J Biol Chem **274**, 4009-4016
- [12] Bock R, Hagemann R, Kössel H und Kudla J (1993)
Tissue- and stage-specific modulation of RNA editing of the *psbF* and *psbL* transcript from spinach plastids - a new regulatory mechanism?
Mol Gen Genet **240**, 238-244
- [13] Bock R Koop HU (1997)
Extraplastidic site-specific factors mediate RNA editing in chloroplasts.
EMBO J. **16**, 3282-3288.
- [14] Boinski J, Wang L, Xu P, Hotchkiss T und Berry J (1993)
Post-transcriptional control of cell type-specific gene expression in bundle sheath and mesophyll chloroplasts of *Amaranthus hypochondriacus*
Plant Mol Biol **22**, 397-410
- [15] Bonham-Smith & Bourque D (1989)
Translation of chloroplast -encoded mRNA: potential initiation and termination signals
Nucl Acids Res **17**, 2057-2080
- [16] Bradford MM (1976)
A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding
Anal Biochem **72**, 248-254

- [17] Bruick RK, Mayfield SP (1999)
Light-activated translation of chloroplast mRNAs.
Trends Plant Sci. **4**, 190-195.
- [18] Bujalowski W, Jung M, McLaughlin LW and Pörschke D. (1986)
Codon-induced association of the isolated anticodon loop of tRNA_{Phe}.
Biochemistry **25**, 6372-6378.
- [19] Cantor CR and Schimmel PR (1980)
Biophysical Chemistry.
W.H. Freeman and Company, San Francisco.
- [20] Carpousis AJ, Vanzo NF, & Raynal LC. (1999)
mRNA degradation. A tale of poly(A) and multiprotein machines.
Trends Genet **15**, 24-28
- [21] Chen, Q., Adams CC, Usak L, Yang J, Monde RA. and Stern DB (1995)
An AU-rich element in the 3' untranslated region of the spinach chloroplast *petD* gene participates in sequence specific RNA-protein complex formation.
Mol. Cell. Biol **15**, 2010-2018.
- [22] Christopher DA & Hoffer PH (1998)
COP1, an Arabidopsis regulatory gene, encodes a protein with both a zinc-binding motif and a G β homologous domain
Cell **71**, 791-801
- [23] Danon A & Mayfield S (1994a)
Light-Regulated translation of Chloroplast Messenger RNAs Through Redox Potential
Science **266**, 1717-1719
- [24] Danon A & Mayfield S (1994b)
ADP-dependent phosphorylation regulates RNA binding in vitro: implications in light-modulated translation
EMBO J **13**, 2227-2235
- [25] Decker CJ & Parker R (1993)
A turnover pathway for both stable and unstable mRNAs in yeast: evidence for a requirement for deadenylation
Genes Dev **7**, 1632-1643
- [26] Deng XW & Gruissem W (1987)
Control of plastid gene expression during development: limited role of transcriptional regulation
Cell **46**, 379-387

- [27] Deng X, Tonkyn J, Peter G, Thornber J & Gruissem W (1989)
Post-transcriptional control of plastid mRNA accumulation during adaptation of chloroplasts to different light quality environments
Plant Cell **1**, 645-654
- [28] Deshpande NN, Bao Y, Herrin DL (1997)
Evidence for light/redox-regulated splicing of *psbA* pre-RNAs in *Chlamydomonas* chloroplasts.
RNA **3**, 37-48.
- [29] Donoghue MJ & Doyle JA (1989)
Phylogenetic studies of seed plants and angiosperms based on morphological characters in: *The Hierarchy of Life: Molecules and Morphology in Phylogenetic Analysis*, Fernholm *et al.*, (Hrsg.), Elsevier, Amsterdam
- [30] Drager RG, Zeidler M, Simpson CL & Stern DB (1996)
A chloroplast transcript lacking the 3' inverted repeat is degraded by 3'→5' exonuclease activity.
RNA **2**, 652-663.
- [31] Drager RG, Girard-Bascou J, Choquet Y, Kindle KL & Stern DB (1998)
In vivo evidence for 5'→3' exonuclease degradation of an unstable chloroplast mRNA.
Plant J **13**, 85-96
- [32] Ehretsmann CP, Carpousis AJ, Krisch HM. (1992)
mRNA degradation in procaryotes.
FASEB J. **6**, 3186-392
- [33] Eibl C, Zou Z, Beck A, Kim M, Mullet, J & Koop, HU (1999)
In vivo analysis of plastid *psbA*, *rbcL* and *rpl32* UTR elements by chloroplast transformation tobacco plastid gene expression is controlled by modulation of transcript levels and translational efficiency.
Plant J **19**, 333-345.
- [34] Fargo DC, Boynton JE & Gillham NW (1999)
Mutations altering the predicted secondary structure of a chloroplast 5' untranslated region affect its physical and biochemical properties as well as its ability to promote translation of reporter mRNAs both in the *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast and in *Escherichia coli*.
Mol Cell Biol **19**, 6980-6990.

- [35] 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**, 2621-2630.
- [36] Goldschmidt-Clermont (1998)
Coordination of nuclear and chloroplast gene expression in plant cells
Int Rev Cytol **190**, 115-180
- [37] Goldschmidt-Clermont M, Choquet Y, Gerard-Biscou J, Michel F, Schirmer-Rahire M & Rochaix J (1991)
A small chloroplast RNA may be required for *trans*-splicing in *Chlamydomonas reinhardtii*
Cell **65**, 135-143
- [38] Goldschmidt-Clermont M, Girard-Bascou J, Choquet Y & Rochaix J (1990)
Trans-splicing mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*
Mol Gen Genet **223**, 417-425
Mayfield S., Yohn C., Cohen A. und Danon A. (1995)
Regulation of Chloroplast Gene Expression
Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol **46**, 147-166
- [39] Gruissem, W, Greenberg BM, Zurawski G & Hallick, RB (1986)
Chloroplast gene expression and promoter identification in chloroplasts extracts.
Meth. Enzymol, **118**, 253-270.
- [40] Gruissem W, Barkan A, Deng X & Stern D (1988)
Transcriptional and post-transcriptional control of plastid mRNA levels in higher Plants
Trends Genet **4**, 258-263
- [41] Gruissem W & Schuster G. (1993)
Control of mRNA stability and degradation in organelles.
In Brawerman, G. and Belasco, J. (Hrsg.), *Control of mRNA stability*. Academic Press, New York, S. 329-365.
- [42] Gruissem W & Tonkyn JC (1993)
Control mechanisms in plastid gene expression.
Crit. Rev. Plant Sci., **12**, 19-55.
- [43] Gutierrez RA, MacIntosh GC & Green PJ (1999)
Current perspectives on mRNA stability in plants: multiple levels and mechanisms of control
Trends Plant Sci **4**, 429-438

- [44] Haff LA, Bogorad L. (1976)
Poly(adenylic acid)-containing RNA from plastids of maize.
Biochemistry. **15**, 4110-4115.
- [45] Hayes R, Kudla J & Gruissem W (1999)
Degrading chloroplast mRNA the role of polyadenylation.
Trends Biochem. Sci., **24**, 199-202.
- [46] Hecker R (1989)
Die Struktur der intermediären Ribonukleinsäuren bei der Replikation von Viroiden
Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- [47] Hedtke B, Börner T & Weihe A (1997)
Mitochondrial and phage-type polymerases in *Arabidopsis*
Science **277**, 809-811
- [48] Heldt HW, Werden K, Milovancev M & Geller, G. (1973)
Alkalization of the chloroplast stroma caused by light dependent proton flux into the thylacoid space.
Biochim. Biophys. Acta, **314**, 224-241.
- [49] Higgs DC, Shapiro RS, Kindle KL & Stern DB (1999)
Small *cis*-acting sequences that specify secondary structures in a chloroplast mRNA are essential for RNA stability and translation.
Mol. Cell. Biol., **19**, 8479-8491.
- [50] Hiratsuka J, Shimada H, Whittier R, Ishibashi T, Sakamoto M, Mori M, Kondo C, Honji Y, Sun C, Meng B, Li Y, Kano C, Nishizawa Y, Hirai A, Shinozaki K & Sugiura M (1989)
The complete sequence of the rice (*Oryza sativa*) chloroplast genome: intermolecular recombination between distinct tRNA genes accounts for a major plastid DNA inversion during the evolution of the cereals
Mol Gen Genet **217**, 185-194
- [51] Hoch B, Maier R, Appel K, Igloi G & Kössel H. (1991)
Editing of a chloroplast mRNA by creation of an initiation codon
Nature **353**, 178-180
- [52] Hofacker L, Fontana, W, Stadler PF, Bonhoeffer S, Tacker M & Schuster P (1994)
Fast folding and comparison of RNA structures
Monatsh Chem **125**, 167-188

- [53] Horlitz (1995)
Spezifischer mRNA-Abbau in Chloroplasten von Tabak (*Nicotiana tabacum*)
Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- [54] Hotchkiss TL, Hollingsworth MJ. (1999)
ATP synthase 5' untranslated regions are specifically bound by chloroplast polypeptides.
Curr Genet. **35**, 512-520.
- [55] Hsu-Ching C & Stern DB (1991)
Specific binding of chloroplast proteins in vitro to the 3' untranslated region of spinach chloroplast *petD* mRNA.
Mol. Cell. Biol., **11**, 4380-4388.
- [56] Hupfer H (2000), Genbank-Nr. AJ271079
- [57] Iratni R, Baeza L, Andreeva A, Mache R & Lerbs-Mache S (1994)
Regulation of rDNA transcription in chloroplasts: promoter exclusion by constitutive repression
Genes Development **8**, 2928-2938
- [58] Jenkins BD, Kulhanek DJ, Barkan A. (1997)
Nuclear mutations that block group II RNA splicing in maize chloroplasts reveal several intron classes with distinct requirements for splicing factors.
Plant Cell. **9**, 283-296.
- [59] Johnson CH, Knight MR, Kondo T, Masson P, Sedbrook J, Haley A, & Trewavas A. (1995)
Circadian oscillations of cytosolic and chloroplastic free calcium in plants.
Science. **269**, 1863-1865.
- [60] Karcher D, Bock R. (1998)
Site-selective inhibition of plastid RNA editing by heat shock and antibiotics: a role for plastid translation in RNA editing.
Nucleic Acids Res **26**, 1185-1190.
- [61] Kim J, Klein PG & Mullet JE (1994)
Synthesis and turnover of photosystem II reaction center protein D1.
J. Biol. Chem., **269**, 17918-17923.
- [62] Kim M Christoher D & Mullet J (1993)
Direct evidence for selective modulation of *psbA*, *rpoA*, *rbcL* and 16S-rRNA RNA stability during barley chloroplast development
Plant Mol Biol **22**, 447-463

- [63] Kirk JTO & Tilney-Bassett RAE (1978)
The Plastids
Amsterdam, 2nd Edition
- [64] Klaff P (1995)
mRNA decay in spinach chloroplasts *psbA* mRNA degradation is initiated by endonucleolytic cleavages within the coding region.
Nucleic Acids Res., **23**, 4885-4892.
- [65] Klaff P & Gruissem W (1991)
Changes in chloroplast mRNA stability during leaf development.
Plant Cell, **3**, 517-529.
- [66] Klaff P & Gruissem W (1995)
Identification of a 43 kD light-regulated chloroplast RNA-binding protein that interacts with the *psbA* 5' nontranslated leader
Photosyn Res **46**, 235-248
- [67] Klaff P, Mundt SM & Steger G (1997)
Complex formation of the spinach chloroplast *psbA* mRNA 5' untranslated region with proteins is dependent on the RNA structure.
RNA, **3**, 1468-1479.
- [68] Klein RR, Mason HS & Mullet JE (1988)
Light-regulated translation of chloroplast proteins. I. Transcripts of *psaA-psaB*, *psbA* and *rbcL* are associated with polysomes in dark grown and illuminated barley seedlings.
J. Cell Biol., **106**, 289-301.
- [69] Klein R. und Mullet J. (1990)
Light-induced transcription of chloroplast gene: *psbA* transcription is differentially enhanced in illuminated barley
J Biol Chem **265**, 1895-1902)
- [70] Klein RR and Mullet J. (1987)
Control of gene expression during higher plant chloroplast development.
J. Biol. Chem., **262**, 4341-4348.
- [71] Krause GH (1977)
Light-induced movement of magnesium ions in intact chloroplasts. Spectroscopic determination with Eriochrome Blue SE.
*Biochim Biophys Acta.***460**, 500-10.
- [72] Kuchka MR, Goldschmidt-Clermont M, Dillewijn JV & Rochaix JD (1989)
Mutation at the *Chlamydomonas* nuclear *NAC2* locus specifically affects stability of the

- chloroplast psbD transcript encoding polypeptide D2 of PS II.
Cell, **58**, 869-876.
- [73] Kudla J, Igloi G, Metzlaff M, Hagemann R & Kössel H (1992)
RNA editing in tobacco chloroplasts leads to the formation of a translatable *psbL* mRNA
by a C to U substitution within the initiation codon
EMBO J **11**, 1099-1103
- [74] Kudla J, Hayes R, Gruissem W. (1996)
Polyadenylation accelerates degradation of chloroplast mRNA.
EMBO J. **15**, 7137-7146.
- [75] Kuroiwa T (1991)
The Replication, Differentiation and Inheritance of Plastids with Emphasis on the Concept of Organelle Nuclei
Int Rev Cytol **128**, 1-62
- [76] Labuda D & Pörschke D (1982)
Magnesium ion inner sphere complex in the anticodon loop of phenylalanine transfer ribonucleic acid.
Biochemistry, **21**, 49-53.
- [77] Lilley, D.M.J. (1999)
Structure, folding and catalysis of the small nucleolytic ribozymes.
Curr. Opin. Struct. Biol., **9**, 330-338.
- [78] Lisitsky I, Klaff P & Schuster G (1996)
Addition of destabilizing poly(A)-rich sequences to endonuclease cleavage sites during the degradation of chloroplast mRNA.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **93**, 13398-13403.
- [79] Lisitsky I, Klaff P & Schuster G (1997)
Blocking polyadenylation of mRNA in the chloroplast inhibits its degradation.
Plant J., **12**, 1173-1178.
- [80] Lück R (1997)
Thermodynamische Vorhersage konservierter Strukturelemente in einzelsträngiger RNA
Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- [81] Lück R, Steger G & Riesner D (1996)
Thermodynamic Prediction of Conserved Secondary Structure: Application to the RRE Element of HIV, the tRNA-like Element of CMV and the mRNA of Prion Protein
J Mol Biol **258**, 813-826

- [82] Lück R, Gräf S & Steger G (1999)
ConStruct - A tool for the prediction of thermodynamic controlled secondary structure
Nucleic Acids Res **27**, 4820-4828
- [83] Lüthi D, Spichiger U, Forster I & McGuigan JAS (1997)
Calibration of Mg^{2+} -selective Macroelectrodes down to $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ in intracellular and Ca^{2+} -containing extracellular solutions
Exp Physiol **82**, 453-467
- [84] Lundberg U, von Gabain A, & Melefors O. (1990)
Cleavages in the 5' region of the ompA and bla mRNA control stability: studies with an E. coli mutant altering mRNA stability and a novel endoribonuclease.
EMBO J. 9, 2731-2741.
- [85] Maliga P (1998)
Two plastid RNA polymerases of higher plants: an evolving story
Trends Plant Sci **3**, 4-6
- [86] 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.
- [87] Mayfield SP, Cohen A, Danon A & Yohn CB (1994)
Translation of the *psbA* mRNA of *Chlamydomonas reinhardtii* requires a structured RNA element contained within the 5' untranslated region.
J. Cell Biol., **127**, 1537-1545.
- [88] Mayfield S, Yohn C, Cohen A & Danon A (1995)
Regulation of Chloroplast Gene Expression
Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol **46**, 147-166
- [89] McCarthy JE, Brimacombe R. (1994)
Prokaryotic translation: the interactive pathway leading to initiation.
Trends Genet. **10**, 402-407.
- [90] Menger M, Tuschl T, Eckstein F & Pörschke D (1996)
 Mg^{2+} -dependent conformational changes in the hammerhead ribozyme.
Biochemistry, **35**, 14710-14716.
- [91] Misra VK & Draper DE (1999)
On the role of magnesium ions in RNA stability.
Biopolymers, **48**, 113-135.

- [92] Miczak A, Kaberdin VR, Wei CL, & Lin-Chao S. (1996)
Proteins associated with RNase E in a multicomponent ribonucleolytic complex.
Proc Natl Acad Sci U S A. 93, 3865-3869.
- [93] Muhlrads D, Decker CJ & Parker R (1994)
Deadenylation of the unstable mRNA encoded by the yeast *MFA2* gene leads to decapping followed by 5'→3' digestion of the transcript
Genes Dev 8, 855-866
- [94] Mullet J (1988)
Chloroplast Development and Gene Expression
Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 39, 475-502
- [95] Nakamura T, Ohta M, Sugiura M & Sugita M. (1999)
Chloroplast ribonucleoproteins are associated with both mRNAs and intron-containing precursor tRNAs.
FEBS Lett. 460, 437-441.
- [96] Nickelsen J, van Dillewijn J, Rahire M & Rochaix JD (1994)
Determinants for stability of the chloroplast *psbD* RNA are located within the short leader region in *Chlamydomonas reinhardtii*.
EMBO J., 13, 3182-3191.
- [97] Nickelsen J, Fleischmann M, Boudreau E, Rahire M & Rochaix JD (1999)
Identification of *cis*-acting RNA leader elements required for chloroplast *psbD* gene expression in *Chlamydomonas*.
Plant Cell, 11, 957-970.
- [98] Nierlich DP & Murakawa GJ (1996)
The decay of bacterial messenger RNA.
Prog Nucleic Acid Res Mol Biol. 52, 153-216.
- [99] Nilsson G, Belasco J, Cohen S & von Gabain A (1984)
Growth-rate dependent regulation of mRNA stability in *Escherichia coli*
Nature 312, 75-77
- [100] Noah JW & Wollenzien P (1998)
Dependence of the 16S rRNA decoding region structure on Mg²⁺, subunit association, and temperature.
Biochemistry, 37, 15444-15448.
- [101] Nyffeler P (1999)
A new ordinal classification of the flowering plants
Trends Ecol Evol 14, 168-170

- [102] Oikawa K, Tanaka K & Takahashi (1998)
Two types of nuclear genes that encode sigma factors for chloroplast RNA polymerase in the red alga *Cyanidium caldarium*
Gene **210**, 277-285
- [103] 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.
- [104] Palmer J. (1985)
Comparative Organisation of Chloroplast Genomes
Annu Rev Genet **19**, 325-354
- [105] 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
- [106] Reinert J, Hrsg. (1980)
Chloroplasts
Monographie, Berlin
- [107] Resnekov O, Rutberg L & von Gabain A. (1990)
Changes in the stability of specific mRNA species in response to growth stage in *Bacillus subtilis*
Proc Natl Acad Sci USA **87**, 8355-8359
- [108] Riesner D, Henco K & Steger G (1991)
Temperature Gradient Gel electrophoresis: a method for the analysis of conformational transitions in nucleic acids and proteins
in: *Advances in electrophoresis*; Chrambach *et al.*, Eds.
- [109] Rochaix, J.-D. (1992)
Post-transcriptional steps in the expression of chloroplast genes.
Ann. Rev. Cell Biol., **8**, 1-28.
- [110] Rodermel SR & Bogorad L.
Molecular evolution and nucleotide sequences of the maize plastid genes for the alpha subunit of CF1 (*atpA*) and the proteolipid subunit of CF0 (*atpH*).
Genetics. **116**, 127-139

- [111] Rosenbaum V, Klahn T, Lundberg U, Holmgren E, v. Gabain A & Riesner D (1987)
Co-existing structures of an mRNA stability determinant
J Mol Biol **229**, 656-670
- [112] Ruf M & Kössel H (1988)
Occurrence of spacing and ribosome recognition sites in mRNAs of chloroplasts from higher plants
FEBS Lett **240**, 41-44
- [113] Sakamoto, W., Kindle, K.L. & Stern, D.B. (1993)
In vivo analysis of *Chlamydomonas* chloroplast *petD* expression using stable transformation of β -glucuronidase translational fusions.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90**, 497-501
- [114] Sakamoto W, Sturm NR, Kindle KL & Stern DB (1994)
petD mRNA maturation in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts: role of 5' endonucleolytic processing.
Mol Cell Biol **14**, 6180-6186
- [115] Salvador, M.L., Klein, U. & Bogorad, L. (1993)
5' sequences are important positive and negative determinants of the longevity of *Chlamydomonas* chloroplast gene transcripts.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90**, 1556-1560.
- [116] 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, Tahdoh 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
- [117] Sakar N (1997)
Polyadenylation of mRNA in Prokaryotes
Annu Rev Biochem **66**, 173-197
- [118] Sambrook J, Fritsch EF & Maniatis T (1989)
Molecular Cloning. A Laboratory manual.
2nd Edition. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
- [119] 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.

- [120] Schumacher J., Randels J. & Riesner D. (1983b)
A two-dimensional electrophoretic technique of the detection of circular viroids and virusoids
Anal Biochem **135**, 288-295
- [121] Schuster, G. & Gruissem, W. (1991)
Chloroplast 3' end processing requires a nuclear encoded RNA-binding protein.
EMBO J **10**, 1493-1503.
- [122] Schuster G, Lisitsky I & Klaff P (1999)
Polyadenylation and degradation of mRNA in the chloroplast.
Plant Phys **120**, 937-944.
- [123] Scott, W.G. & Klug, A. (1996)
Ribozymes structure and mechanism in RNA catalysis.
Trends Biochem. Sci., **21**, 220-224.
- [124] Sexton TB, Christopher DA, Mullet JE.
Light-induced switch in barley psbD-psbC promoter utilization: a novel mechanism regulating chloroplast gene expression.
EMBO J. **9**, 4485-4494.
- [125] Shiina, T., Allison, L. & Maliga, P. (1998)
rbcL transcript levels in tobacco plastids are independent of light reduced dark transcription rate is compensated by increased mRNA stability.
Plant Cell, **10**, 1713-1722.
- [126] Shine J & Dalgarno L (1974)
The 3'-terminal sequence of Escherichia coli 16S ribosomal RNA: complementary to nonsense triplets and ribosome binding sites
Proc Natl Acad Sci USA **71**, 1342-1346
- [127] Sitte P, Falk H & Liedvogel B (1980)
Chromoplasts
in: Pigments in Plants, S. 117-148, Stuttgart, 2nd Edition
- [128] Soltis RE, Soltis PS, Mort, ME, Chase MW, Savolainen V, Hoot SB & Morton CM (1998)
Inferring complex phylogenies using parsimony: an empirical approach using three large data sets for angiosperms
Syst Biol **47**, 32-42
- [129] Soltis PS, Soltis DE, Wolf PG, Nickrent DL, Chaw SM & Chapman RL. (1999)
The phylogeny of land plants inferred from 18S rDNA sequences: pushing the limits of

- rDNA signal?
Mol Biol Evol. **16**, 1774-1784.
- [130] Somanchi A & Mayfield SP (1999)
Nuclear-chloroplast signalling
Curr Op Plant Biol **2**, 404-409
- [131] Spreitzer R, Goldschmidt-Clermont M, Rahire M & Rochaix J (1985)
Nonsense mutations in the *Chlamydomonas* chloroplast gene that codes for the large subunit of ribulosebiphosphate carboxylase/oxygenase
Proc Natl Acad Sci USA **82**, 5460-5464
- [132] Staub JM & Maliga P (1994)
Translation of *psbA* mRNA is regulated by light *via* the 5' untranslated region in tobacco plastids.
Plant J., **6**, 547-553.
- [133] Stern DB & Gruissem W (1987)
Control of plastid gene expression: 3' inverted repeats act as mRNA processing signals and stabilizing elements, but do not terminate transcription
Cell **51**, 1145-1157
- [134] Stern DB, Radwanski ER & Kindle K (1991)
A 3' stem-loop structure of the *Chlamydomonas* chloroplast *atpB* gene regulates mRNA accumulation *in vivo*.
Plant Cell, **3**, 285-297.
- [135] Sugita M & Sugiura M (1996)
Regulation of gene expression in chloroplasts of higher plants
Plant Mol Biol **32**, 315-326
- [136] Sugiura M. (1989)
The Chloroplast Chromosomes in Land Plants
Annu. Rev Cell Biol **5**, 51-70
- [137] Sugiura M. (1992)
The chloroplast genome
Plant Mol Biol **19**, 149-168
- [138] Sugiura M, Hirose T & Sugita M. (1998)
Evolution and mechanism of translation in chloroplasts.
Annu Rev Genet. **32**, 437-459

- [139] Svab Z, Hajdukiewicz P & Maliga P (1990)
Stable transformation of plastids in higher plants
Proc Natl Acad Sci USA **87**, 149-168
- [140] Tanaka M., Wakasugi T., Sugita M., Shinozaki K. & Sugiura M. (1986)
Genes for the eight ribosomal proteins are clustered on the Chloroplast genome of tobacco (*Nicotiana tabacum*): Similarity to the S10 and *spc* operons of *Escherichia coli*
Proc Natl Acad Sci USA **83**, 6030-6034
- [141] Tiller K & Link G (1993)
Phosphorylation and dephosphorylation affect functional characteristics of chloroplast and etioplast transcription
EMBO J **12** 1745-1753
- [142] Tozawa Y, Tanaka K, Takahashi H & Wakasa K (1998)
Nuclear encoding of a plastid sigma factor in rice and its tissue and light dependent expression
Nucleic Acids Res **26**, 415-419
- [143] Vytvytska O, Jakobsen JS, Balcunaite G, Andersen JS, Baccarini M & von Gabain A. (1998)
Host factor I, Hfq, binds to *Escherichia coli* ompA mRNA in a growth rate-dependent fashion and regulates its stability.
Proc Natl Acad Sci USA. **95**, 14118-14123.
- [144] Vytvytska O, Moll I, Kaberdin VR, von Gabain A & Bläsi U (2000)
Hfq (HF1) stimulates *ompA* mRNA decay by interfering with ribosome binding
Genes Dev **14**, 1109-118
- [145] Wakasugi T, Tsudzuki J, Ito S, Nakashima K, Tsudzuki T & Sugiura M (1994)
Loss of all *ndh* genes as determined by sequencing the entire chloroplast genome of the black pine *Pinus thunbergii*
Proc Natl Acad Sci USA **91**, 9794-9798
- [146] Westhoff P. (1985)
Transcription of the gene encoding the 51 kD chlorophyll a apoprotein of the Photosystem II reaction centre from spinach
Mol Gen Genet **201**, 115-121
- [147] Workmann C & Krogh A (1999)
No evidence that mRNAs have lower folding free energies than random sequences with the same dinucleotide distribution
Nucleic Acids Res **27**, 4816-4822

- [148] Yang, J., Schuster, G. & Stern, D.B. (1996)
CSP41, a sequence specific chloroplast mRNA binding protein, is an endoribonuclease.
Plant Cell, **8**, 1409-1420.
- [149] Ylstra B & McCormick S (1999)
Analysis of mRNA stabilities during pollen development and in BY2 cells
Plant J **20**, 101-108
- [150] Yohn CB, Cohen A, Danon A, & Mayfield SP. (1996)
Altered mRNA binding activity and decreased translational initiation in a nuclear mutant lacking translation of the chloroplast psbA mRNA.
Mol Cell Biol. **16**, 3560-3566.
- [151] Zhang W, Truttmann AC, Lüthi D & McGuigan JAS (1995)
The Manufacture and Characteristics of Magnesium Selective Macroelectrodes
Magnesium Bulletin **17**, 125-130
- [152] Zhang W, Truttmann AC, Lüthi D & McGuigan JAS (1997)
Apparent Mg^{2+} -adenosine 5'-triphosphate dissociation constant measured with Mg^{2+} macroelectrodes under conditions pertinent to ^{31}P NMR ionized magnesium determinations.
Anal. Biochem **251**, 246-250.
- [153] Zhao YY, Xu T, Zucchi P & Bogorad L (1999)
Subpopulations of chloroplast ribosomes change during photoregulated development of Zea mays leaves: ribosomal proteins L2, L21, and L29.
Proc Natl Acad Sci USA **96**, 8997-9002.
- [154] Zurawski, G., Bohnert, H.J., Whitfeld, P.R. & Bottomley, W. (1982)
Nucleotide sequence of the gene for the Mr 32,000 thylacoid membrane protein from *Spinacea oleracea* and *Nicotiana debneyi* predicts a totally conserved primary translation product of Mr 38,950.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **79**, 7699-7703.
- [155] Zurawski, G., Perrot, B., Bottomley, W. & Whitfeld, P.R. (1981)
The structure of the gene for the large subunit of the ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase from spinach chloroplast DNA.
Nucleic Acids Res., **9**, 3251-3270.
- [156] Zimmerman SB, Cohen GH & Davies DR (1975)
X-ray fiber diffraction and model-building study of polyguanylic acid and polyinosinic acid
J Mol Biol **92**, 181-192

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß ich meine Dissertation selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt sowie Zitate kenntlich gemacht habe.

Düsseldorf, den 13. Juni 2000

A handwritten signature in black ink, reading "Martin Horlitz". The script is cursive and fluid, with the first name "Martin" and last name "Horlitz" clearly distinguishable.

(Martin Horlitz)