

**Die Wechselwirkung divalenter Kationen
mit Strukturelementen der chloroplastenkodierten
psbA mRNA**

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von
Thyra Parthen
aus Frankenberg

Düsseldorf
2004

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

Referentin: Frau Priv.-Doz. Dr. Petra Wolff

Koreferent: Herr Uni.-Prof. Dr. Dieter Willbold

Tag der mündlichen Prüfung: 03. Juni 2004

Der mRNA-Stabilitätsgruppe

Danksagung

Mein Dank gilt an erster Stelle meiner Doktormutter Frau PD Dr. Petra Wolff. Dank ihres Engagements, den unzähligen Diskussionen und dem ihr eigenen kritischen Optimismus habe ich während dieser Arbeit nie das Ziel aus den Augen verloren und konnte mich auch in schwierigen Phasen immer wieder motivieren.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Detlef Riesner, daß ich diese Arbeit in seinem Institut anfertigen konnte.

Bei Frau Regine Lüpertz bedanke ich mich für ihren großen Einsatz im Fortgeschrittenen-Praktikum, in dem sie das Minimalkonstrukt etablierte.

Herrn Dr. Michael Schmitz schulde ich besonderen Dank für die endlosen Stunden, die er vor dem Sigma verbracht hat, damit ich die optischen Schmelzkurven für diese Arbeit messen konnte. Außerdem ein herzliches Dankschön, daß ich mit allen Rechnerproblemen bei ihm stets ein offenes Ohr gefunden habe.

Herrn Prof. Dr. Gerhard Steger danke ich für seine Hilfe bei der Erstellung und Interpretation der Energielandschaften und die vielen konstruktiven Diskussionen zu den thermodynamischen Analysen.

Herrn Bernd Esters danke ich für seine Hilfsbereitschaft bei allen Fragen rund um die TGGE und anderen Unwegsamkeiten im Laboralltag.

Meinen beiden Labornachbarinnen – Sandra Sensken und insbesondere Nadine Kolonko – gilt mein herzlicher Dank für die schöne Zeit, die wir in Raum 41 verbracht haben, und natürlich die vielen fachlichen und nicht-fachlichen Gespräche.

Bei Frau Dina Grohmann bedanke ich mich, daß sie trotz großer räumlicher Entfernung die Mühe auf sich genommen hat, diese Arbeit Korrektur zu lesen.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Der Chloroplast	1
1.2	Genexpression in Chloroplasten	2
1.2.1	Das Plastom	2
1.2.2	Die Transkription	3
1.2.2.1	Plastidäre RNA-Polymerasen	3
1.2.2.2	σ -Faktoren	4
1.2.2.3	Promotoren	4
1.2.2.4	Transkriptionstermination	5
1.2.3	Posttranskriptionale Mechanismen	5
1.2.3.1	Editierung	5
1.2.3.2	Prozessierung	6
1.2.3.3	Spleißvorgänge	7
1.2.3.4	mRNA Stabilität	7
1.2.4	Die Translation	8
1.3	Die Degradation von mRNAs im Chloroplasten	9
1.3.1	Beteiligte Enzyme	10
1.3.2	Polyadenylierung	11
1.3.3	Modell der mRNA Degradation in Chloroplasten	11
1.3.4	Modelle für eine Regulation der mRNA Degradation	12
1.4	Die <i>psbA</i> mRNA	14
1.5	RNA-Struktur und Mg^{2+}	17
1.6	Aufgabenstellung	18
2	Material & Methoden	21
2.1	Allgemeines	21
2.1.1	Häufig verwendete Puffer und Lösungen	21
2.1.2	Nukleinsäuren	22
2.1.2.1	Oligonukleotide	22
2.1.2.2	Verwendete Plasmide	22
2.1.3	Fällung von Nukleinsäuren	22
2.1.3.1	Natriumacetat/Ethanol Fällung	22
2.1.3.2	Ammoniumacetat/Ethanol Fällung	23
2.1.4	Phenol/Chloroform Extraktion	23

2.1.5	Herstellung eines Nukleinsäure-Längenstandards	23
2.2	Präparative Methoden	24
2.2.1	Isolation von Chloroplasten	24
2.2.1.1	Aufzucht	24
2.2.1.2	Isolation intakter Chloroplasten	24
2.2.1.3	Proteinbestimmung nach Bradford	25
2.2.2	Herstellung der verwendeten <i>in vitro</i> Transkripte	25
2.2.2.1	Polymerasekettenreaktion (PCR)	25
2.2.2.2	Herstellung von Guanylyl-(5'-3')-Guanosin (GpG)	26
2.2.2.3	<i>In vitro</i> Transkription	27
2.2.2.4	Radioaktive 5'-Endmarkierung durch γ - Phosphorylierung	28
2.2.2.5	Aufreinigung von Nukleinsäuren durch Gelelektion	28
2.2.2.6	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	29
2.2.3	Herstellung des Minimalkonstrukts	29
2.2.3.1	Asymmetrische PCR des Oligonukleotids 1	30
2.2.3.2	Phosphorylierung des Oligonukleotids 2	30
2.2.3.3	Hybridisierung	31
2.2.3.4	Ligation	31
2.3	Biophysikalische Methoden	32
2.3.1	Gelelektrophorese	32
2.3.1.1	Denaturierende Gelelektrophorese	32
2.3.1.2	Sequenziergele	32
2.3.1.3	Temperaturgradientengelelektrophorese (TGGE)	32
2.3.1.4	Nachweis von Nukleinsäuren durch Autoradiographie	33
2.3.1.5	Silberfärbung von Nukleinsäuren	33
2.3.2	Quervernetzung von RNA durch UV-Licht	34
2.3.3	Optische Denaturierungskurve	34
2.3.4	Theoretische Sekundärstrukturvorhersage	35
2.3.5	Spezifische Hydrolyse von RNA mit Pb^{2+} -Ionen	36
2.3.5.1	Pb^{2+} -Spaltung von <i>in vitro</i> Transkripten	36
2.3.5.2	Pb^{2+} -Spaltung <i>in organello</i>	36
2.3.6	Chemische Strukturanalyse mit DEPC	37
2.4	Biochemisch-enzymatische Methoden	37
2.4.1	Sequenzierung von DNA	37
2.4.2	Primer Extension Analyse	39
3	Ergebnisse	41
3.1	Auswahl von RNA-Bereichen	41
3.1.1	Energielandschaft der <i>psbA</i> mRNA	42
3.1.2	Ausgewähltes Fragment der <i>psbA</i> mRNA	43
3.2	Strukturanalyse des 5'-Endes der <i>psbA</i> mRNA	45
3.2.1	TGGE-Analyse des 5'-Endes der <i>psbA</i> mRNA	45

3.2.2	Optische Denaturierungskurve des 5'-Endes der <i>psbA</i> mRNA . . .	49
3.2.3	Chemische Sekundärstrukturanalyse des 5'-Endes mit DEPC . . .	52
3.3	UV-Quervernetzung im <i>in vitro</i> Transkript (-86/+822)	55
3.4	Analyse der <i>psbA</i> mRNA durch spezifische Hydrolyse mit Pb ²⁺ -Ionen . .	57
3.4.1	Mechanismus der spezifischen Hydrolyse von RNA mit Pb ²⁺ -Ionen	57
3.4.2	Pb ²⁺ -Spaltung 5'-seitig verkürzter <i>in vitro</i> Transkripte	59
3.4.3	Pb ²⁺ -Spaltung der <i>psbA</i> mRNA <i>in organello</i>	71
3.5	Minimalkonstrukt eines <i>long range</i> Strukturelements der <i>psbA</i> mRNA . .	78
3.5.1	Design des Minimalkonstrukts	78
3.5.2	Thermodynamische Analyse des Minimalkonstrukts	81
3.5.2.1	TGGE-Analyse des Minimalkonstrukts	81
3.5.2.2	Optische Denaturierungskurve des Minimalkonstrukts . .	83
3.5.3	Chemische Strukturanalyse des Minimalkonstrukts	87
3.5.3.1	Modifizierung des Minimalkonstrukts mit DEPC	87
3.5.3.2	Pb ²⁺ -Spaltung des Minimalkonstrukts	89
3.5.3.3	Die Sekundärstruktur des Minimalkonstrukts	91
4	Diskussion	93
4.1	Strukturelemente der <i>psbA</i> mRNA	94
4.1.1	Das 5'-Ende der <i>psbA</i> mRNA	94
4.1.2	Der GAAA-Tetra-loop	95
4.1.3	Das <i>long range</i> Strukturelement	97
4.2	Die <i>psbA</i> mRNA: Ein RNA-Strukturschalter?	99
4.2.1	Mg ²⁺ -Ionen und die Struktur der <i>psbA</i> mRNA	100
4.2.2	Zwei Populationen der <i>psbA</i> mRNA – ein Modell	101
4.3	Ausblick	103
5	Zusammenfassung	105
A	Sequenzen	107
A.1	Sequenzen der Oligonukleotide	107
A.2	Sequenz der <i>psbA</i> mRNA	109
A.3	Sequenz des Minimalkonstrukts und der verwendeten Oligonukleotide . .	110
B	Aufgeführte plastidäre Gene und ihre Funktion	111
C	Organismen, deren Plastome vollständig sequenziert sind	113
	Literatur	114

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar(e)
C	Cytosin
Ci	Curie
cpm	counts per minute
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
ddNTPs	Didesoxynukleotidtriphosphate
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dNTPs	Desoxynukleotidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherischia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
G	Guanosin
h	Stunde(n)
IR	inverted repeat
kBp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
min	Minute(n)
mRNA	Boten-/messenger-RNA
nt	Nukleotid(e)
NA	Nukleinsäure
NTP	Ribonukleotidtriphosphate
PAA	Polyacrylamid
PCR	Polymerasekettenreaktion
rRNA	ribosomale RNA
SD-Sequenz	Shine-Dalgarno-Sequenz
T	Thymidin
TEMED	Tetramethylendiamin
TGGE	Temperaturgradientengelelektrophorese
tRNA	Transfer-RNA
U	Uracil
UTR	untranslatierte Region einer mRNA

1 Einleitung

1.1 Der Chloroplast

Chloroplasten sind Zellorganellen, die es in allen eukaryotischen, photoautotrophen Organismen – Pflanzen und Algen – gibt. In ihnen laufen alle wichtigen Reaktionen der Photosynthese ab, daher sind sie essentiell für die Energieversorgung der Pflanze und der Erzeugung von Biomasse.

Chloroplasten entwickeln sich bei Belichtung parallel zur Blattentwicklung aus den undifferenzierten Proplastiden, die man in meristematischen Geweben findet. Während der Plastidenentwicklung wird das Volumen vergrößert und die Thylakoide und die Photosynthese-assoziierten Proteinkomplexe müssen assembliert werden. Neben den Chloroplasten können Proplastiden auch zu Leukoplasten, Chromoplasten oder Etioplasten ausdifferenzieren. Die farblosen Leukoplasten finden sich vor allem in photosynthetisch inaktiven Pflanzengeweben und dienen der Speicherung von Stärke (Amyloplasten), Proteinen (Proteinoplasten) und Fetten (Elaioplasten). Chromoplasten enthalten vorwiegend Carotinoide und sorgen für die Färbung von Blütenblättern und Früchten. Werden Keimlinge im Dunklen angezogen, entwickeln sich Etioplasten, die zwar eine den Chloroplasten vergleichbare Größe haben, aber ansonsten wenig ausdifferenziert sind. Bei Belichtung differenzieren die Etioplasten sehr schnell zu Chloroplasten. Alle Plastidenformen sind ineinander umwandelbar, wobei Gerontoplasten, alternde Plastiden, die in ihrer Pigmentzusammensetzung den Chromoplasten ähneln, die einzige Ausnahme darstellen.

Plastiden werden wie Mitochondrien als „semiautonome“ Zellorganellen bezeichnet, da sie über ein eigenes Genom und einen Apparat zu dessen Expression verfügen. Sie vermehren sich durch Teilung und können von der Zelle nicht *de novo* synthetisiert werden. Bei Zellteilungen werden sie passiv auf die Tochterzellen verteilt. Trotzdem sind die Plastiden in allen ihren Funktionen vom Zellkern abhängig, da viele Faktoren, die sie für ihre Funktion benötigen, im Kern kodiert sind. Nach der Endosymbiontentheorie geht man davon aus, daß sich die Plastiden aus einem den Cyanobakterien zuzuordnenden Vorläufer entwickelt haben, der von einer eukaryotischen Zelle aufgenommen wurde und mit ihr eine Symbiose eingegangen ist. Für diese Theorie sprechen viele Indizien. Zum Beispiel sind Plastiden von zwei Membranen umgeben, die sich stark in ihrer Zusammensetzung und Funktionalität unterscheiden. Außerdem haben das Genom und der Expressionsapparat von Plastiden typische prokaryotische Eigenschaften (ringförmige DNA, 70 S Ribosomen, polycistronische Transkripte, Promotoren, tRNAs) und viele plastidäre Proteine entsprechen einem homologen Protein in Bakterien.

1.2 Genexpression in Chloroplasten

Die Entwicklung ausdifferenzierter Plastiden – wie den Chloroplasten – aus Proplastiden erfordert eine entwicklungspezifische Regulation der Genexpression, die auch in Anpassung auf Umwelteinflüsse, wie z. B. Licht, Wasser- und Nährstoffverfügbarkeit, moduliert werden kann. Genregulation kann dabei auf Ebene der DNA (Methylierung, Struktur), der Transkription, der mRNA (posttranskriptionale Prozesse), der Translation und des Proteins (posttranslational) erfolgen [51, 101, 151, 158]. Studien zur Genexpression in Chloroplasten werden vor allem in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Arabidopsis thaliana*, *Zea mays*, *Spinacea oleracea* und *Nicotiana tabacum* durchgeführt. *Chlamydomonas reinhardtii* und *Nicotiana tabacum* werden mittlerweile routinemäßig transformiert [15, 161].

1.2.1 Das Plastom

Als Plastom bezeichnet man das Genom von Chloroplasten, das aus einem ringförmigen DNA-Molekül besteht und in der Regel hochpolyploid vorliegt. Das Plastom ist 120–160 kBp groß und kodiert für etwa 120–150 Gene (ca. 100 Gene kodieren für Proteine und die weiteren für rRNAs und tRNAs; zur Übersicht siehe [159]). Mittlerweile sind über 20 Plastome aus allen Bereichen des Pflanzenreichs vollständig sequenziert (siehe Anhang C). Das Plastom ist in eine invertierte Sequenzwiederholung (IR; Inverted Repeat), die Gene für rRNAs und einige tRNAs enthält, einen kurzen einfach vorhandenen Sequenzbereich (SSC; short single copy region) und einen langen einfach vorhandenen Sequenzbereich (LSC; large single copy region), die die weiteren Gene tragen, unterteilt. Die Unterschiede in der Plastomgröße resultieren vorwiegend aus der Länge der IR, die zwischen 6 kBp und 76 kBp liegt.

Die Gene sind – wie bei Prokaryonten – oft in Operons organisiert, die zum Teil in ihrer Zusammensetzung auch noch ein bakterielles Homolog haben, wie z. B. das *rpl23*-Operon aus *Nicotiana tabacum*, das dem *S10*-Operon aus *E. coli* entspricht. Es finden sich sowohl funktionell homogene Operons (*rpoB-rpoC1-rpoC2*) als auch funktionell heterogene (*psaA-psaB-rps14*). Eine Reihe plastidärer Gene enthält Introns, die posttranskriptional durch Spleißen entfernt werden müssen (1.2.3.3).

Man teilt die Gene in zwei Gruppen ein: Gene, die für Bestandteile des genetischen Apparates kodieren (RNA Polymerase, ribosomale Proteine und funktionale RNAs), und Gene, die für Bestandteile des Photosyntheseapparates kodieren. Außerdem gibt es einige offene Leserahmen, deren Genprodukte und Funktion noch nicht bekannt sind. Für alle funktionalen Komplexe ist nur etwa ein Drittel der benötigten Proteine im Chloroplasten kodiert. Die anderen sind im Zellkern kodiert, werden im Cytoplasma translatiert und erst als fertiges Protein in den Chloroplasten importiert. Dagegen konnte ein Import von RNAs in den Chloroplasten bisher nicht gezeigt werden, so daß alle funktionalen RNAs im Chloroplasten kodiert sein müssen. Die bisher bekannten Plastome kodieren für 20–40 tRNAs, was zwar eine relativ geringe Anzahl im Vergleich zu autonomen Or-

ganismen (ca. 60 tRNAs) darstellt, aber für die korrekte Translation im Chloroplasten ausreicht.

Es gibt einige Hinweise, daß die Genexpression auf DNA-Ebene reguliert werden kann. So ändert sich in *Chlamydomonas reinhardtii* die DNA-Struktur in Abhängigkeit vom Licht [162] und in Mais gibt es Hinweise auf spezifische DNA-Methylierung [48]. In *Chlamydomonas reinhardtii* hat man zudem den Effekt der Gendosis untersucht [41]. Alle diese Mechanismen scheinen aber letztendlich nur geringen Einfluß auf die Genexpression zu haben.

1.2.2 Die Transkription

In vielen Systemen ist die Genexpression weitgehend auf der Ebene der Transkription reguliert. Hierbei ist die Ausbildung des Transkriptionsinitiationskomplexes der limitierende Schritt. Er hängt von der Promotorstärke, der Polymeraseaktivität und diversen Transkriptionsfaktoren ab. In Chloroplasten findet ebenfalls Genregulation auf Ebene der Transkription statt, allerdings scheint diesem Mechanismus hier weniger Bedeutung zuzukommen [50, 101, 151].

1.2.2.1 Plastidäre RNA-Polymerasen

Die plastidären Gene werden durch zwei unterschiedliche RNA-Polymerasen transkribiert (zur Übersicht siehe [61]). Eine RNA-Polymerase ist im Plastom kodiert und wird als PEP (**P**lastid **E**ncoded **P**olymerase) bezeichnet. Die andere ist im Zellkern kodiert und wird entsprechend als NEP (**N**ucleus **E**ncoded **P**olymerase) bezeichnet. Die PEP besteht aus mehreren Untereinheiten (α , β , β' und β''), die von den plastidären Genen *rpoA*, *rpoB*, *rpoC1* und *rpoC2* kodiert werden. Die PEP ist bis hin zur Organisation des Operons der bakteriellen RNA-Polymerase homolog (*rpoB-rpoC1-rpoC2* bilden eine Transkriptionseinheit; Aufspaltung von *rpoC* (*E. coli*) in *rpoC1* und *rpoC2* wie in Cyanobakterien). Die NEP besteht aus einer einzelnen Polypeptidkette und ist ca. 110kDa groß [91]. Sie wird im Zellkern von dem Gen *rpoZ* kodiert und hat Homologie zur RNA-Polymerase des T7-Bakteriophagen. Eine ähnliche Polymerase ist auch in Mitochondrien aktiv. Experimente in PEP-defizienten Chloroplasten aus Tabak legten bisher die Interpretation nahe, daß die NEP vorwiegend die sogenannten „Housekeeping“-Gene (genetischer Apparat, basale Funktionen) transkribiert, während die Photosynthese-assoziierten Gene von der PEP transkribiert werden [4, 53, 144]. Einer neueren Studie zufolge kann allerdings zumindest die NEP alle plastidären Gene transkribieren und der regulatorische Effekt in PEP-defizienten Chloroplasten scheint sich eher durch posttranskriptionale Mechanismen erklären zu lassen [82].

1.2.2.2 σ -Faktoren

Die bakterielle RNA-Polymerase benötigt für ihre korrekte Funktion zusätzliche Faktoren, wie die σ -Faktoren, die differentiell exprimiert und verwendet werden. Auch die PEP ist mit σ -Faktoren assoziiert (zur Übersicht siehe [3]). Die bisher identifizierten σ -Faktoren sind ausnahmslos im Zellkern kodiert. Auch hat man bisher immer mehrere verschiedene Gene gefunden, die für σ -Faktoren kodieren. Das legt die Vermutung nahe, daß sie – ähnlich wie in Bakterien – differentiell in der Entwicklung oder als Antwort auf physiologische Stimuli exprimiert und verwendet werden. In *Zea mays* sind solche entwicklungspezifischen σ -Faktoren bekannt [142]. In *Sinapis alba* wurde ein σ -Faktor beschrieben, der in Abhängigkeit seines Phosphorylierungszustandes aktiv ist und dessen Aktivität damit indirekt durch den Photosynthese-Status reguliert wird [163, 164]. Damit stellen die σ -Faktoren eine Möglichkeit dar, wie der Zellkern in die Genexpression des Chloroplasten auf Ebene der Transkription eingreifen kann. Für den σ -Faktor ZmSig2B aus *Zea mays* konnte *in vitro* seine Funktionalität gezeigt werden, indem er die Bindung der *E. coli*-Polymerase an einen plastidären Promotor vermittelte. ZmSig2B scheint sowohl im Chloroplasten als auch in den Mitochondrien lokalisiert zu sein. Da Mitochondrien keine Polymerase vom bakteriellen Typ haben, stellt sich die Frage, ob der Faktor auch mit der T7-homologen Polymerase interagiert [8]. Die T7-Polymerase aus Phagen benötigt keine weiteren Faktoren. Inwiefern das auch für ihr Homolog in Chloroplasten zutrifft, ist nicht bekannt.

1.2.2.3 Promotoren

Das Plastom enthält verschiedene Promotorelemente (zur Übersicht siehe [61]). Da eine Polymerase vom bakteriellen Typ beschrieben wurde, ist auch ein bakterieller Promotortyp zu erwarten. Entsprechend findet man vor diversen Genen das für Bakterien typische -10/-35 Element, allerdings nicht nur konserviert, sondern auch in Variationen. Es gibt zusätzlich zum -10/-35 Promotor weitere Elemente wie z. B. ein licht-induzierbares Promotorelement bei dem *psbC-psbD*-Operon [27, 145]. Ein anderer Promotortyp wird von der NEP benutzt. Diese Promotoren sind noch nicht weiter klassifiziert und werden bisher nur als non-consensus TypII Promotoren bezeichnet [72]. Für einige tRNA-Gene wurden interne Promotoren beschrieben, die keinerlei zusätzliche Elemente vor dem Transkriptionsstart benötigen [113, 116]. Es wäre denkbar, daß die Promotoren in Kombination mit den unterschiedlichen Polymerasen und Transkriptionsfaktoren (z. B. σ -Faktoren) eine differentielle Genexpression erlauben, allerdings ist das bisher noch nicht eindeutig gezeigt. Alle bisherigen Daten deuten darauf hin, daß die Genexpression im Chloroplasten auf Ebene der Transkription in allgemeiner Weise reguliert wird, aber nicht die entscheidende Rolle bei genspezifischer Regulation spielt [82, 101].

1.2.2.4 Transkriptionstermination

Über die Termination der Transkription in Chloroplasten ist wenig bekannt. Die meisten plastidären Gene besitzen an ihrem 3'-Ende eine Sequenzwiederholung, die als 3'-IR (**I**nverted **R**epeat) bezeichnet wird und eine Haarnadelstruktur ausbilden kann. In Bakterien funktionieren solche Strukturen als *rho*-unabhängige Transkriptionsterminatoren. In Chloroplasten sind sie als Terminatoren ineffizient, aber wichtig für die korrekte 3'-Prozessierung von mRNAs [150]. Wie die von der NEP synthetisierten Transkripte terminiert werden, ist nicht bekannt. Vermutlich spielt die Transkriptionstermination in Chloroplasten eine untergeordnete Rolle und wird von der Prozessierung der primären Transkripte überlagert.

1.2.3 Posttranskriptionale Mechanismen

Für viele plastidäre Gene wurde gezeigt, daß ihre mRNA-Spiegel im Laufe der Entwicklung schwanken, obwohl die Transkriptionsrate gleich bleibt oder ihre Translationsrate durch Modulationen des mRNA-Pools verändert wird [50, 101, 151]. Dies deutet darauf hin, daß die plastidäre Genexpression zu einem großen Teil durch posttranskriptionale Mechanismen reguliert wird. Zu diesen posttranskriptionalen Mechanismen gehören die Prozessierung von Primärtranskripten zu monocistronischen mRNAs mit korrektem 5'- und 3'-Ende, das Spleißen von Intronsequenzen, die Editierung der Transkripte und Modulationen der mRNA Stabilität (zur Übersicht siehe [101, 110, 127, 158]).

1.2.3.1 Editierung

Unter Editierung versteht man die posttranskriptionale Veränderung der Primärsequenz eines Transkripts durch Austausch von Basen. Dieser Prozeß geht den anderen posttranskriptionalen Mechanismen voran, da bis auf wenige Ausnahmen die Editierung die erste posttranskriptionale Modifikation ist, die ein plastidäres Transkript erfährt (zur Übersicht siehe [11, 98]). Es sind bisher 26 Positionen in plastidären Genen höherer Pflanzen bekannt, die editiert werden. Die Anzahl der Stellen, die editiert werden, ist von Art zu Art unterschiedlich. An allen bekannten Stellen wird dabei ein C gegen ein U ausgetauscht. Dabei handelt es sich vermutlich um eine enzymatische Umwandlung, da keine Schnitte am Phosphatrückgrat oder an den Basen nachgewiesen werden konnten. Es ist unklar, wie die Stellen, die editiert werden sollen, erkannt werden, da es keine Konsensussequenzen gibt. Indizien weisen darauf hin, daß kernkodierte Faktoren die Editierung vermitteln. Einer neueren Studie zufolge, scheint sogar jede zu editierende Stelle ihren eigenen kernkodierten Faktor zu benötigen, da in heterologen Kern-Chloroplast-Systemen nur die Stellen editiert werden, die in beiden homologen Systemen vorkommen [139]. Die Editierung erfolgt in der Regel, um ein funktionales Startcodon zu generieren (ACG → AUG) [12, 65, 85] oder eine konservierte Aminosäure zu restaurieren [97]. Mittlerweile kennt man auch Beispiele, bei denen Basen in der 5'

untranslatierten Region (UTR) editiert werden. Man vermutet, daß dadurch die Fähigkeit, regulatorische Sekundärstrukturen auszubilden, erhalten bleibt [83].

1.2.3.2 Prozessierung

Die Mehrheit der neusynthetisierten mRNAs im Chloroplasten sind polycistronische Transkripte, die – wie oben erwähnt – kein definiertes 3'-Ende besitzen. Um reife, stabile und effizient translatierbare mRNAs zu erhalten, werden die Primärtranskripte prozessiert.

Das 5'-Ende primärer Transkripte weist eine Di- oder Triphosphatgruppe auf, während 5'-prozessierte Transkripte ein Monophosphat besitzen. In der Regel findet man im Chloroplasten beide Formen. Für einige Beispiele in *Chlamydomonas reinhardtii* ist beschrieben, daß die unprozessierten Transkripte nicht translatiert werden [20, 115]. Für die *rbcL* mRNA aus Mais sind verschieden lange prozessierte 5'-Enden beschrieben [43], die zwar alle mit Polysomen assoziiert sind [6], aber eine unterschiedliche Translations-effizienz haben [125]. Es ist nicht klar, welche Proteine die 5'-Prozessierung vermitteln. In *Chlamydomonas reinhardtii* wird eine 5'→3' Exonuklease diskutiert, für die es aber bisher nur indirekte Hinweise gibt [36].

Korrekt prozessierte 3'-Enden sind notwendig für die Akkumulation von Transkripten. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, daß einzelsträngige 3'-Enden ideale Startstellen für 3'→5' exonukleolytischen Abbau darstellen. Das reife 3'-Ende wird bis direkt an die Haarnadelstruktur am 3'-Ende gekürzt, die als Prozessierungssignal notwendig ist [150]. Es gibt drei mögliche Mechanismen für die 3'-Prozessierung, die alle von Daten unterstützt werden: (i) sequenz- oder strukturspezifischer endonukleolytischer Schnitt [56], (ii) dem endonukleolytischen Schnitt folgt exonukleolytische Prozessierung, die durch die Haarnadelstruktur gestoppt wird [153] und (iii) das 3'-Ende wird ausschließlich durch exonukleolytischen Abbau bis zur Haarnadelstruktur prozessiert [150, 152]. Die an der 3'-Prozessierung beteiligten Proteine sind vermutlich auch in den RNA-Abbau involviert, wobei nicht klar ist, wie der Chloroplast zwischen Abbau der mRNA und ihrer Prozessierung diskriminiert (siehe dazu auch 1.3).

Eine weitere Form der Prozessierung ist die intercistronische Prozessierung, bei der aus polycistronischen Primärtranskripten monocistronische, reife mRNAs entstehen. Es gibt einige Beispiele, bei denen die intercistronische Prozessierung relevant für die Translation der kodierten Proteine ist. So wurde bei *Arabidopsis thaliana* gezeigt, daß die *psbH* mRNA korrekt prozessiert sein muß, um translatiert werden zu können [46]. Es wurde weiterhin beobachtet, daß die polycistronischen Primärtranskripte zu einer Vielzahl, auch überlappender mRNAs prozessiert werden [49], die je nach Entwicklungszustand differentiell akkumulieren können [32, 155]. Ein neueres Beispiel für diesen Mechanismus wurde in *Allium porrum* beschrieben. Hier akkumuliert das translatierbare Transkript von *psaC* nur, wenn ein Schnitt in der sich anschließenden Sequenz von *ndhD* erfolgt [22].

1.2.3.3 Spleißvorgänge

Viele plastidäre Gene enthalten Introns, die posttranskriptional entfernt werden (zur Übersicht siehe [101, 110, 127, 158]). Introns werden nach ihrer Struktur und dem Spleißmechanismus in verschiedene Gruppen eingeteilt. In höheren Pflanzen findet man vorwiegend Introns der Gruppe II, während im Genom von *Chlamydomonas reinhardtii* vorwiegend Gruppe I Introns, die *in vitro* unter nicht-physiologischen Bedingungen selbstspleißend sind, vorkommen. Es sind ebenfalls Twintrons (Introns, die ein weiteres Intron enthalten) beschrieben [29, 30, 37] und Introns, die ein offenes Leseraster enthalten [112, 157]. Die meisten plastidären Introns werden *in cis* gespleißt. Es gibt aber auch Beispiele für *trans*-spleißende Introns, bei denen Exons, die über das Genom verteilt sind, zusammengefügt werden müssen. Das komplexeste Beispiel hierfür ist die *psaA* mRNA aus *Chlamydomonas reinhardtii*, die aus drei Exons besteht, 14 kernkodierte Faktoren und eine weitere plastidäre RNA *tscA* für ihr korrektes Spleißen benötigt [127]. Bisher konnte für das Spleißen keine regulatorische Funktion auf die Genexpression gezeigt werden.

1.2.3.4 mRNA Stabilität

Die differentielle Stabilität von mRNAs gewinnt zunehmend an Bedeutung für die Genexpression im Chloroplasten. Die Stabilisierung bzw. Destabilisierung einzelner Transkripte wurde sowohl im Verlauf der Chloroplastenentwicklung, sowie auch als Reaktion auf Belichtung beobachtet [74, 77]. Als *cis*-regulatorische Elemente werden die 5' UTR und die 3' UTR der mRNAs diskutiert. Als *trans*-regulatorische Faktoren kommen einige kernkodierte Faktoren in Frage (zur Übersicht siehe [101, 110, 158]).

Die 3' UTR der meisten plastidären mRNAs enthält ein Sequenzmotiv (3'-IR), das eine Haarnadelstruktur ausbilden kann. Wie oben beschrieben, übt diese Struktur im Chloroplasten – im Gegensatz zum bakteriellen System – keine Funktion in der Termination der Transkription aus, stellt aber ein wichtiges Prozessierungssignal dar. Das unterstützen auch Daten zur Proteinbindung an die 3' UTR, da hier vorwiegend Proteine binden, die der Prozessierung zugeordnet werden können [110, 158]. Weiterhin hat sich gezeigt, daß mRNAs, denen diese Struktur fehlt, sehr schnell abgebaut werden, also diese Struktur sehr wirksam vor 3'→5' exonukleolytischem Abbau schützt [1, 57, 39, 90, 130, 154]. Dies weist auf eine Funktion der Haarnadelstruktur am 3'-Ende als allgemeiner Schutz vor exonukleolytischem Abbau hin. Die Struktur ist zur Vermittlung und Regulation der mRNA Stabilität allein allerdings nicht ausreichend, wie Studien an der *petD* mRNA gezeigt haben [130, 150, 152, 154].

Die 5' UTR ist nach Studien in *Chlamydomonas reinhardtii* hinreichend zur Vermittlung der mRNA Stabilität bei *petD* [36], *psbD* [117] und *psbB* [166]. Für die mRNAs *petD* und *psbD* wurde gezeigt, daß bei Mutationen, die zu veränderter mRNA Stabilität führen, offensichtlich die Bindestelle für einen kernkodierten Faktor defekt ist [62, 115]. Für die mRNAs *rps7* [45] und *petD* [62] konnte weiterhin in der 5' UTR eine für die

Stabilität wichtige Sekundärstruktur identifiziert werden. Auch in höheren Pflanzen ist die 5' UTR an der Vermittlung der Stabilität beteiligt, wie Daten für die *rbcL* mRNA aus Mais [7] und Tabak [146] zeigen.

In *Chlamydomonas reinhardtii* sind mehrere Mutanten kernkodierter Faktoren bekannt, die genspezifisch auf die plastidäre mRNA Stabilität zu wirken scheinen. Die am besten untersuchte Mutante ist *nac2-26*, bei der die Bindung eines 47 kDa Protein an die 5' UTR von *psbD* verlorengelht und die mRNA im Vergleich zum Wildtyp destabilisiert ist [117]. Transkripte, die eine 5' UTR von höheren Pflanzen enthalten, sind in *Chlamydomonas reinhardtii* instabil [114]. Auch konnten bisher in höheren Pflanzen keine genspezifischen *trans*-regulatorischen Faktoren für die Stabilität gefunden werden. Daher kann man davon ausgehen, daß die Stabilität von mRNAs in Algen und Pflanzen auf unterschiedliche Weise reguliert wird und die Systeme nur bedingt vergleichbar sind.

Die 5' UTR enthält neben den *cis*-regulatorischen Elementen für die mRNA Stabilität auch Bereiche, die für die Translation wichtig sind. Daher stellt sich die Frage, inwiefern die mRNA Stabilität ein der Translation untergeordneter oder ein davon unabhängiger Effekt ist. Die *petD* mRNA akkumuliert in Abhängigkeit von ihrer Translatierbarkeit [133]. Die *rbcL* mRNA zeigt in höheren Pflanzen eine Stabilisierung durch Assoziation in Polysomen [7, 146]. Die *psbA* mRNA wird durch Veränderung der Ribosomenbindestelle destabilisiert [100]. In Spinat konnte gezeigt werden, daß das S1-ähnliche ribosomale Protein an die 5' UTR der *psbA* mRNA bindet [2]. Die Daten zeigen allerdings keine einheitliche Wirkung der Translation auf die mRNA Stabilität, so daß man bislang von unabhängigen Mechanismen ausgeht.

Neben den UTRs gibt es in einigen Fällen auch Hinweise, daß Bereiche in der kodierenden Region an der Vermittlung der Stabilität beteiligt sind. Im Fall der *atpA* mRNA hat man einen kernkodierten, stabilitätsvermittelnden Faktor identifiziert, der mit der kodierenden Region interagiert [40]. Für die *psbA* mRNA in höheren Pflanzen gibt es aus Experimenten mit transplastomem Tabak Hinweise, daß die 5' UTR allein nicht die volle Stabilisierung vermittelt kann [42].

1.2.4 Die Translation

Wie der Transkriptionsapparat hat auch der Translationsapparat in Chloroplasten große Ähnlichkeit zum bakteriellen System. Die Ribosomen sind die prokaryotischen 70 S Ribosomen, etwa die Hälfte der plastidären Gene hat eine Shine-Dalgarno-ähnliche Sequenz (SD-Sequenz) und die Translation beginnt mit der tRNA^{f_{met}} (zur Übersicht siehe [101, 160, 175]). Außerdem wurden homologe Proteine zu Translationsinitiationsfaktoren aus *E. coli* gefunden (IF-1 Homolog in Spinat; IF-2 und IF-3 Homologe in Euglena). Die SD-Sequenz ist in *E. coli* in Sequenz und Position relativ zum Startcodon stark konserviert. Sie spielt eine entscheidende Rolle bei der Bindung der Ribosomen an die mRNA. In Chloroplasten scheint die SD-Sequenz jedoch nicht essentiell für die Translation zu sein, da sie bei der Hälfte der plastidären Gene nicht vorhanden und bei den anderen Genen weder in Sequenz noch Position konserviert ist [14, 132]. *In vitro* Studien

in Tabak [64] und Gerste [73] deuten darauf hin, daß die SD-Sequenzen zwar Einfluß auf die Translation haben, aber nicht entscheidend sind [151]. Als *cis*-Elemente für die Ribosomenassemblierung werden in Chloroplasten Sekundärstrukturelemente in der 5' UTR diskutiert [44, 62, 81]. In Tabak hat man zwei AU-reiche Regionen identifiziert, die für die Ribosomenbindung wichtig sind [64]. Weiterhin hat man in Mais [7] und in *Chlamydomonas reinhardtii* [54] kernkodierte Faktoren identifiziert, die mit der 5' UTR von mRNAs interagieren und einen Effekt auf die Translation haben. In *Chlamydomonas reinhardtii* kann die Wirkung spezifischer Translationsfaktoren z. B. über deren Oxidationszustand reguliert werden, der vom Elektronenfluß entlang der Photosynthese und damit von den Lichtverhältnissen abhängig ist [35]. Für die *psbA* mRNA aus *Chlamydomonas reinhardtii* und das Protein RB60 ist eine solche Regulation der Translation beschrieben [165]. Translationsfaktoren können auch über Phosphorylierungs-/Dephosphorylierungszyklen reguliert werden [34]. Ein autoregulativer Mechanismus ist für das Cytochrom f aus *Chlamydomonas reinhardtii* bekannt. Die Akkumulation des Proteins im Chloroplast führt zur Reduktion der Syntheserate. Dieser Effekt wird über die 5' UTR der *petA* mRNA und den C-Terminus des Cytochrom f vermittelt [25, 87, 88]. Bei Tabak ist zwar die Sequenzhomologie sehr hoch, es ist aber nicht klar, ob die Regulation dem gleichen Mechanismus folgt [109]. Bisher konnten nur in *Chlamydomonas reinhardtii* genspezifisch wirkende Faktoren gefunden werden.

Die Regulation der Translation ist in *Chlamydomonas reinhardtii* am besten untersucht [127]. Hier werden eine Reihe möglicher Mechanismen diskutiert. Es wurde gezeigt, daß die korrekte Prozessierung von 5'- und 3'-Ende einer mRNA in *Chlamydomonas reinhardtii* entscheidend für ihre Translation ist [20, 129]. Korrekte Prozessierung ist ebenfalls für die Translation des *ndhD* Transkript aus Tabak notwendig [63]. Ein diesem Mechanismus entgegenstehendes Beispiel ist das *psbB*-Operon aus Mais, das ein komplexes Prozessierungsmuster hat. Das Primärtranskript sowie alle Intermediate sedimentieren mit Polysomen und können damit potentiell translatiert werden [7]. Daten aus *Chlamydomonas reinhardtii* zeigen allerdings, daß nicht die Ribosomenbindung, sondern die Translationsinitiation der limitierende Schritt der Translation ist [9, 104]. So findet man in der *Chlamydomonas reinhardtii* Mutante *nac1-28* zwar eine Assemblierung der *psbD* mRNA in Polysomen, die Elongation ist jedoch blockiert [28]. Diese Daten stellen in Frage, ob man Polysomenbindung als Indiz für Translation werten kann.

1.3 Die Degradation von mRNAs im Chloroplasten

Die mRNA Stabilität spielt eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Genexpression im Chloroplasten, indem sie genspezifisch die Spiegel der plastidären mRNAs festlegt. Die Konzentration einer mRNA ergibt sich aus dem Verhältnis ihrer Transkriptionsrate zu ihrer Abbaurate. Dadurch erhält der Mechanismus der mRNA Degradation eine regulatorische Funktion (zur Übersicht siehe [55, 110, 141]). Eine Frage dabei ist, ob die Degradation von mRNAs – wie Transkription und Translation – dem Mechanismus in Prokaryoten vergleichbar ist [23, 24, 124].

1.3.1 Beteiligte Enzyme

Im bakteriellen System wurde ein Multienzymkomplex – das Degradosom – charakterisiert, das den Abbau von mRNAs vermittelt (zur Übersicht siehe [23]). Das Degradosom besteht aus der RNase E (sequenzspezifische Endonuklease), der PNPase (3'→5' Exonuklease) und der DEAD-Box Helikase B. Außerdem sind mit dem Komplex eine Enolase, ein glykolytisches Enzym, eine Polyphosphatkinase, DnaK und GroEL assoziiert. Die Funktion dieser Proteine im Abbauprozess ist noch nicht geklärt. Auch Interaktion mit dem ribosomalen Protein S1 und einer Poly(A)-Polymerase wurde gezeigt. Neben der RNase E wurde noch eine weitere homologe Endonuklease gefunden, die allerdings nur aus dem N-terminalen, katalytischen Teil besteht. Dieses Enzym wird RNase G genannt. Die Spezifität beider Enzyme scheint weitgehend gleich zu sein. So erkennen sie ein Sequenzmotiv, sind abhängig von einem freien 5'-Ende, wobei sie 5'-Enden mit einem Monophosphat bevorzugen, und haben eine strenge Präferenz für einzelsträngige RNA [23].

Von diesen Enzymen ist im Chloroplasten am besten die PNPase charakterisiert. Es handelt sich um ein 100 kDa großes Protein, das 3'→5' exonukleolytische Aktivität hat, als Bestandteil eines ca. 600 kDa großen Komplex aufgereinigt werden kann [56] und eine hohe Affinität zu poly(A)-Sequenzen besitzt [95]. Der Komplex stellte sich einer neueren Studie zufolge allerdings nicht als plastidäres Degradosom heraus, sondern ist ein Homomultimer der PNPase [5]. In einer früheren Studie konnte zusammen mit dem Komplex ein 67 kDa großes Protein aufgereinigt werden, das mit einem Antikörper gegen RNase E aus *E. coli* kreuzreagierte [56]. Eine massenspektrometrische Analyse zeigte jedoch, daß es sich hierbei um die α und die β Untereinheit von GroEL handelt [5]. Eine Kreuzreaktion von GroEL mit diversen Antikörpern ist bekannt (z. B. [147]). Eine Datenbankrecherche zeigte RNase E-homologe Sequenzen in Pflanzen, die aber alle nur dem N-terminalen Bereich der bakteriellen RNase E entsprechen und daher korrekter Weise als RNase G-homolog bezeichnet werden sollten [5]. In *E. coli* ist bekannt, daß die C-terminale Domäne der RNase E essentiell für die Assemblierung des Degradosoms ist. Da die im Chloroplasten gefundenen Sequenzen diese Domäne nicht enthalten und auch die PNPase nicht mit anderen Proteinen interagiert, kann man davon ausgehen, daß es im Chloroplasten kein Degradosom gibt, aber der mRNA Abbau zumindest teilweise von den gleichen Enzymen wie in Prokaryoten vermittelt wird. Eine RNA Helikase und die RNase II, eine in Prokaryoten wichtige Exonuklease, wurden bisher im Chloroplasten nicht gefunden.

Neben den Enzymen, die homologen Proteinen aus dem bakteriellen Degradosom entsprechen, gibt es auch Hinweise, daß Proteine, die an der mRNA Prozessierung beteiligt sind, auch Schritte des Abbaus vermitteln. So wurde die Endonuklease CSP41 identifiziert, die mit hoher Spezifität die Struktur des 3'-IR erkennt und schneidet [13, 172]. In *Chlamydomonas reinhardtii* wird zur Zeit auch eine potentielle 5'→3' exonukleolytische Aktivität diskutiert [38]. Für diese gibt es aber bisher nur indirekte experimentelle Hinweise, die auch z. B. durch die Spezifität eines RNase E-Homolog erklärt werden könnten. In Bakterien konnte bisher keine 5'→3' Exonukleaseaktivität gefunden werden.

1.3.2 Polyadenylierung

Polyadenylierung von mRNA galt lange Zeit als Eigenschaft eukaryotischer Zellen, in denen fast alle mRNAs am 3'-Ende polyadenyliert sind [169]. Hier vermittelt der Poly(A)-Anhang der reifen mRNA Stabilität und ist an der Translationsinitiation beteiligt. In Hefe ist bekannt, daß die Deadenylierung von mRNAs Teil des Abbaupfades ist. In Bakterien dagegen konnte Polyadenylierung in Zusammenhang mit der Einleitung der Degradation gebracht werden [10, 24, 134]. In Chloroplasten ist die Polyadenylierung von RNA schon seit 1976 bekannt [52], aber erst in jüngerer Zeit weiter untersucht worden. RT-PCR Studien zeigten, daß die Poly(A)-Anhänge in Chloroplasten von Pflanzen mit ca. 260 nt wesentlich länger sind als in Prokaryoten und Hefe (40–60 nt), nicht homogen zusammengesetzt sind, sondern zu 70% aus Adenosin, 25% aus Guanosin und 5% aus Cytosin bestehen, und fast immer in der kodierenden Region beginnen [84, 93]. Die Polyadenylierung in *Chlamydomonas reinhardtii* scheint allerdings eher der in *E. coli* zu gleichen [80]. Die Sequenzpositionen, an denen bei der *psbA* mRNA aus Spinat Polyadenylierung beobachtet wird, stimmen mit in einem *in vitro* Degradationssystem gezeigten Schnittstellen [93], sowie bekannten Schnittstellen kurz vor der 3' UTR überein [84]. Das legt nahe, daß es sich bei den polyadenylierten Fragmenten um Abbauprodukte handelt, die so zum Substrat für 3'→5' exonukleolytischen Abbau durch die PNPase werden. Bisher konnte keine poly(A)-unabhängige Degradation von mRNA in Chloroplasten beobachtet werden [94].

Bis heute konnte keine Poly(A)-Polymerase, wie sie in *E. coli* beschrieben ist, in Chloroplasten gefunden werden. Allerdings stellte sich heraus, daß in Spinat die PNPase, die eigentlich den poly(A)-abhängigen Abbau von mRNAs vermittelt, ebenfalls in der Lage ist RNA-Fragmente zu polyadenylieren. Die Poly(A)-Anhänge, die die PNPase synthetisiert, entsprechen in ihrer Länge und Zusammensetzung dem, was aus Chloroplasten bekannt ist [173]. Auch aus *E. coli* ist bekannt, daß die PNPase RNA polyadenylieren kann [108]. Bisher konnte in Chloroplasten keine Poly(A)-Aktivität unabhängig von der PNPase aufgereinigt werden. Auch konnte bei einer Sequenzsuche in *Arabidopsis thaliana* keine Poly(A)-Polymerase gefunden werden, die auch ein plastidäres Transitpeptid trägt [173]. Andererseits findet man in PNPase-defizienten Mutanten in *Arabidopsis thaliana* trotz fehlender PNPase Polyadenylierung im Chloroplasten [168]. Erst weitere Studien können somit klären, welches Enzym die Polyadenylierung tatsächlich vermittelt.

1.3.3 Modell der mRNA Degradation in Chloroplasten

Nach der derzeitigen Vorstellung wird die Degradation durch einen oder mehrere endonukleolytische Schnitte in 5'→3'-Richtung – vermutlich durch ein RNase E-Homolog – eingeleitet. Ein direkter exonukleolytischer Abbau in 3'→5' wird durch die vom 3'-IR gebildete Haarnadelstruktur in der 3' UTR verhindert. Die entstandenen Fragmente werden von der PNPase oder einer potentiellen plastidären Poly(A)-Polymerase erkannt.

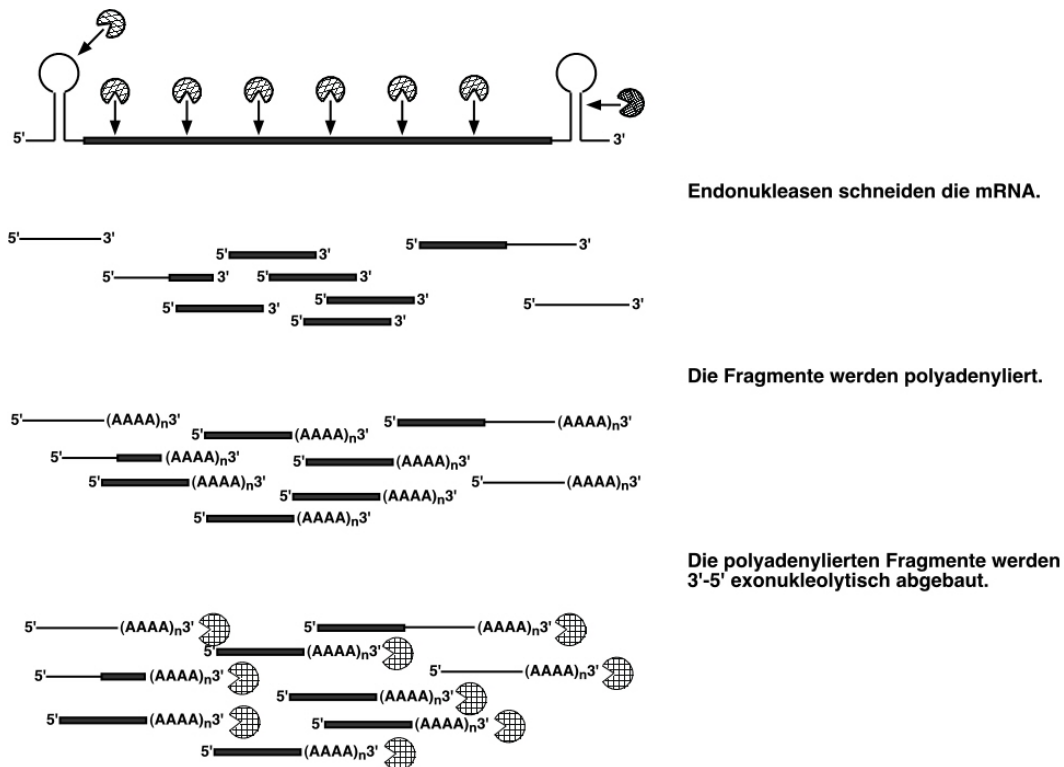


Abbildung 1.1: **Modell der spezifischen Degradation einer chloroplastidären mRNA**

Zunächst synthetisiert das Enzym einen Poly(A)-Anhang an das 3'-Ende des mRNA Fragments. Das Intermediat wird dann von der PNPase erkannt und exonukleolytisch in $3' \rightarrow 5'$ -Richtung abgebaut. Die Struktur des distalen Fragmentes, das durch die Haarnadelstruktur geschützt ist, könnte durch einen Schnitt der Endonuklease CSP41 zerstört werden, so daß die daraus resultierenden Fragmente dann für den regulären Abbauweg zugänglich sind. Dieses Modell ist in Abb. 1.1 dargestellt.

1.3.4 Modelle für eine Regulation der mRNA Degradation

Wie unter 1.2.3.4 beschrieben, ergibt sich die Stabilität einer mRNA – bei weitgehend gleicher Transkriptionsrate – aus ihrer Abbaurate. Um die Genexpression auf Ebene der mRNA Stabilität zu regulieren, muß also der Abbau der mRNA kontrolliert werden.

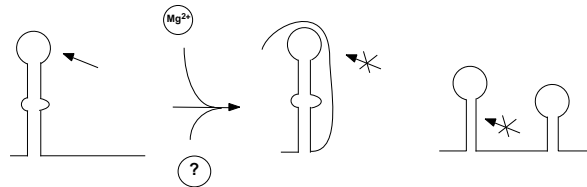
Für die entwicklungspezifisch stabilitätsregulierte *psbA* mRNA in Spinat ist gezeigt, daß der erste endonukleolytische Schnitt in der 5'UTR liegt, die damit als *cis*-regulatorisches Element für den Abbau angesehen werden kann [75]. Das gleiche ist für die *psbD* mRNA in *Chlamydomonas reinhardtii* beschrieben [117]. Geht man davon aus, daß der erste Schnitt den Abbau initiiert, so hat die Regulation dieser Spaltung Schlüsselfunktion für die Kontrolle der mRNA Stabilität. Die Zugänglichkeit einer solchen Schnittstelle

für die initiiierende Endonuklease wäre damit der geschwindigkeitsbestimmende und zu regulierende Schritt. Sie kann über drei mögliche Mechanismen, die in Abb. 1.2 zusammengefaßt sind, kontrolliert werden.

1. Regulation durch Proteinbindung



2. Regulation durch RNA-Strukturgleichgewichte



3. Regulation durch RNA-Struktur-abhängige Proteinbindung

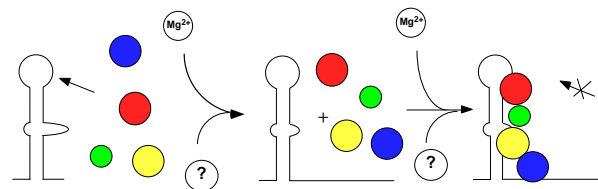


Abbildung 1.2: **Regulationsmodelle für den Abbau stabilitätsregulierter chloroplastidärer mRNAs.** 1. Regulation durch Proteinbindung; 2. Regulation durch ein RNA-Strukturgleichgewicht; 3. Regulation durch strukturabhängige Proteinbindung

1. Regulation durch Proteinbindung Die Schnittstelle des initiiierenden, endonukleolytischen Schnittes liegt in einem für die Proteinbindung an die 5' UTR relevanten Bereich und könnte durch die hier bindenden Proteine vor dem Angriff einer Endonuklease geschützt werden. Wenigstens eines dieser Proteine muß dafür ein an die Stabilitätsänderung angepaßtes Bindungsverhalten zeigen. Für die *psbA* mRNA aus Spinat ist ein

solches Protein beschrieben, daß eine entwicklungspezifische Konzentrationsabhängigkeit zeigt und ein *trans*-regulatorischer Faktor sein könnte [78]. Ein weiteres Beispiel, dem dieser Regulationsmechanismus zugrunde liegen könnte, ist die *nac2-26* Mutante aus *Chlamydomonas reinhardtii*. Hier korreliert der Verlust der Bindung eines Proteins an die 5' UTR mit der Destabilisierung der *psbD* mRNA. Es wäre also denkbar, daß Proteine durch Bindung an die RNA die Schnittstelle maskieren und so der Abbau der mRNA verhindert wird (Abb. 1.2.1). Ein solches Modell erfordert jedoch eine Vielzahl genspezifisch RNA-bindender Proteine, für die in höheren Pflanzen bislang keine Evidenz vorliegt.

2. Regulation durch die Struktur der RNA Eine andere Möglichkeit wäre, daß die Schnittstelle durch Umlagerung der Struktur für die beteiligte Endonuklease unzugänglich wird (Abb. 1.2.2). Die Endonukleasen im Chloroplast zeigen eine klare Spezifität für einzelsträngige Bereiche [66]. Geht man davon aus, daß im Chloroplast – wie in *E. coli* – der Abbau durch Schnitte der RNase E induziert wird, muß die initiiierende Schnittstelle in einem einzelsträngigen Bereich liegen, da das Enzym bei Stemloop-Strukturen in der 5' UTR seine Schnittstelle nicht mehr erkennt, und die Lage der Schnittstelle den Kontakt des Enzyms zum 5'-Ende erlauben muß (siehe 1.3). Durch eine Strukturumlagerung könnten beide Bedingungen für einen RNase E-Schnitt umgangen werden. Die 5' UTR der *psbA* mRNA aus Spinat kann alternative Strukturen ausbilden, in denen die Schnittstelle durch Helixbildung unzugänglich ist. Die Regulation fände in diesem Fall über ein Strukturgleichgewicht statt und ein Verlust der Proteinbindung könnte auf die fehlende Bindung von Nukleasen hindeuten [79].

3. Regulation durch RNA-Struktur abhängige Proteinbindung Eine Kombination aus diesen beiden Regulationsmechanismen ist in Abb. 1.2.3 dargestellt. Die Proteinbindung ist in diesem Fall von der Struktur der Bindestelle abhängig. Ein Strukturgleichgewicht aus bindungsaktiven und -inaktiven Strukturen würde die Assoziation mit vor Abbau schützenden Proteinen an die 5'UTR regulieren. Die Stabilität der mRNAs *petD* [62] und *psbD* [115] scheint nach diesem Prinzip reguliert zu werden. Für diesen Mechanismus ist nicht unbedingt ein genspezifisches Protein als *trans*-regulatorischer Faktor erforderlich, da der eigentlich regulierende Schritt die Strukturumlagerung auf RNA-Ebene ist. Als potentieller *trans*-regulatorischer Faktor für die Strukturumlagerung werden im Fall der *psbA* mRNA aus Spinat Mg^{2+} -Ionen diskutiert ([67]; siehe auch 1.4).

1.4 Die *psbA* mRNA

Das plastidäre Gen *psbA* kodiert für das D1 Protein des Photosystem II. Bei Belichtung wird das Protein durch die photochemischen Reaktionen irreversibel geschädigt und muß daher zur Aufrechterhaltung des Photosyntheseapparates ständig ersetzt werden [103].

Um den permanenten Nachschub an Protein bei Belichtung zu gewährleisten, ist die *psbA* mRNA im reifen Chloroplast hochabundant und ihre Translation stark lichtreguliert.

In vivo Untersuchungen in Spinat zeigten, daß die *psbA* mRNA korrelierend mit der Blatt-/Chloroplastenentwicklung stark stabilitätsreguliert ist. In jungen Blättern beträgt ihre Halbwertszeit 4–5 Stunden, die in reifen Blättern bis auf 10 Stunden ansteigt. Die Halbwertszeit der *rbcl* mRNA dagegen steigt von 4,5 nur unwesentlich auf 5 Stunden an [77]. Die Transkriptionsraten der beiden Gene ändern sich dabei relativ zueinander nicht [49]. Die differentielle Stabilisierung der *psbA* mRNA wurde auch in Gerste gezeigt [74]. Sie ist wesentlich für die starke Akkumulation der mRNA und kein sekundärer Effekt, der auf die Assoziation in Polysomen oder andere Prozesse zurückgeführt werden kann [77].

Wie oben beschrieben (1.3), ist der Mechanismus des Abbaus einer mRNA und vor allem die Einleitung des Abbaus entscheidend für ihre Stabilität. Viele Daten, die in das in Abb. 1.1 dargestellte Modell eingegangen sind, wurden an der *psbA* mRNA aus Spinat gezeigt, so daß dieses Modell in erster Linie den Abbauweg der *psbA* mRNA wiedergibt. Der Abbau der *psbA* mRNA wird durch einen endonukleolytischen Schnitt an Position –48/–49 (relativ zum Startcodon; [176]) eingeleitet, dem weitere endonukleolytische Schnitte in 5'→3'-Richtung folgen [66, 75]. Die Schnittstellen zeigen keine Konsensussequenz, die eine Erkennungsstelle für Endonukleasen sein könnte, liegen aber nach Sekundärstrukturvorhersagen alle in einzelsträngigen Bereichen [76], was mit der Einzelstrangspezifität plastidärer Nukleasen korreliert [66]. Die Fragmente, die durch die Schnitte entstehen, werden am 3'-Ende polyadenyliert und dadurch dem schnellen 3'→5' exonukleolytischen Abbau durch die PNPase zugeführt [93, 94, 95].

In Experimenten mit einer kombinierten Verzögerungs-Temperaturgradientengelelektrophorese konnte gezeigt werden, daß die 5' UTR der *psbA* mRNA in zwei verschiedenen Konformationen vorliegen kann, von denen eine Struktur Komplexe mit löslichen, chloroplastidären Proteinen ausbilden kann [79]. Bei der Suche nach Proteinen, die eine *trans*-regulatorische Funktion bei der Vermittlung der Stabilität der *psbA* mRNA ausüben könnten, wurden durch Markierungstransferexperimente drei Kandidaten, die an die 5' UTR binden, identifiziert: (i) das ribosomale S1-ähnliche Protein [2], (ii) die Nuklease CSP41, die eine Rolle in der 3'-Prozessierung spielt [13, 172] und (iii) ein Protein, das Homologie zu einem cDNA-Klon aus *Arabidopsis thaliana* hat, dessen Funktion aber unbekannt ist (Klaff, unveröffentlichte Daten). Es gibt aber zur Zeit keine Hinweise, daß ein Protein genspezifisch die Stabilität der *psbA* mRNA in höheren Pflanzen beeinflusst.

In vitro Studien an der *psbA* mRNA zeigen einen deutlichen Stabilisierungseffekt in Abhängigkeit von der Magnesiumkonzentration. Im Vergleich mit drei weiteren plastidären RNAs – der *rbcl* mRNA, der 16S rRNA und der tRNA^{His} – zeigte sich, daß der Stabilisierungseffekt durch Mg²⁺-Ionen genspezifisch ist. Die *psbA* mRNA weist mit zunehmender Magnesiumkonzentration ein sigmoides Stabilisierungsprofil auf, das auf einen kooperativen Effekt mehrerer Mg²⁺-Ionen, die an die mRNA binden, schließen läßt. Dagegen zeigen die anderen untersuchten RNAs einen mehr oder weniger steilen

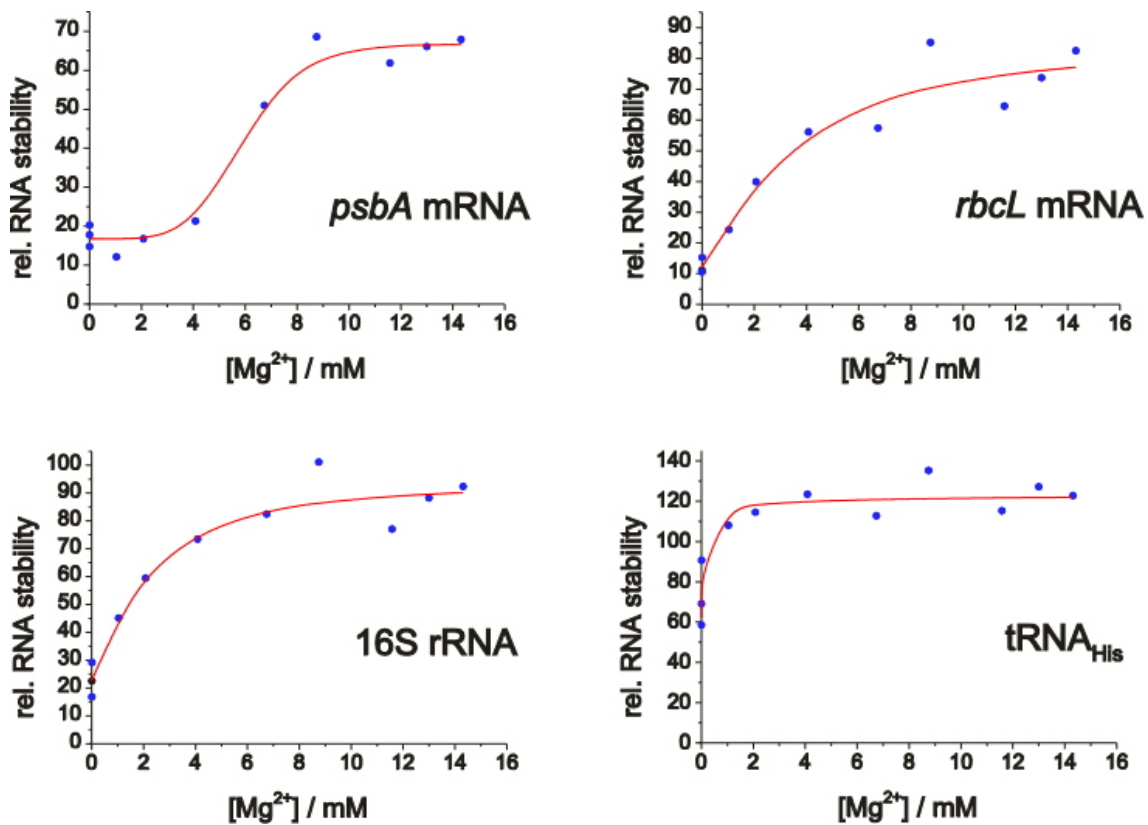


Abbildung 1.3: **Stabilisierungsprofile plastidärer RNAs in Abhängigkeit von Mg^{2+} -Ionen.** Abbildung entnommen aus Horlitz & Klaff (2000) [67]; Für die Berechnung der relativen Stabilität wird auf die Literaturstelle verwiesen.

Sättigungsverlauf. Die *psbA* mRNA ist bis zu einer Magnesiumkonzentration von 3–4 mM instabil. Mit dem weiteren Anstieg der Magnesiumkonzentration wird die *psbA* mRNA dann mit einem sigmoid verlaufenden Profil stabilisiert und erreicht bei 10 mM ein Stabilitätsmaximum (Abb. 1.3). Die Werte der Magnesiumkonzentrationen von 3–4 mM und 10 mM entsprechen dem Umfang, in dem die Magnesiumkonzentration im Chloroplasten während der Entwicklung ansteigt. Im jungen Chloroplasten/Etioplasten liegt eine Magnesiumkonzentration von 3–4 mM vor, die *psbA* mRNA ist in diesem Stadium der Entwicklung instabil, und im Laufe der Chloroplastenentwicklung steigt die Konzentration auf über 10 mM an, wobei die *psbA* mRNA im reifen Chloroplasten eine sehr starke Stabilisierung erfährt [66, 67]. Daraus resultiert, daß Mg^{2+} -Ionen hinreichend sind, um die genspezifische Stabilisierung der *psbA* mRNA zu vermitteln und damit als potentieller *trans*-regulatorischer Faktor der mRNA Stabilität wirken.

1.5 RNA-Struktur und Mg^{2+}

Ein RNA-Molekül liegt nicht als lineare Kette von Nukleotiden vor, sondern bildet Sekundär- und Tertiärstrukturen aus. Je nach biologischer Funktion der betrachteten RNA ist diese Struktur von essentieller Bedeutung, wie bei den ribosomalen RNAs und den tRNAs. Die mRNAs tragen in erster Linie die Information zur Biosynthese von Proteinen, so daß ihre Struktur eine untergeordnete Rolle spielt. Allerdings finden sich immer mehr Beispiele für Sekundärstrukturen in den UTRs von mRNAs, die für Regulationsmechanismen von Bedeutung sind (siehe dazu 1.2.3). So wurden vor kurzer Zeit sogenannte Riboswitch-Elemente in den untranslatierten Bereichen bakterieller Operons beschrieben. Riboswitch-Elemente sind natürliche RNA-Aptamere, also kleine Sequenzabschnitte, die eine Sekundärstruktur ausbilden. Diese Sekundärstruktur bindet mit extrem hoher Spezifität ein Substrat, worüber die Expression des betreffenden Gens oder Operons – ohne die Beteiligung weiterer Faktoren – reguliert wird. Bei den Substraten handelt es sich um Metaboliten wie Vitaminvorstufen, Lysin oder Guanin, die direkt an die Riboswitch-Elemente binden (zur Übersicht siehe [118] und [167]).

Die Faltung von Nukleinsäuren in ihre native Konformation verläuft fast immer als zweistufiger Prozess. Im ersten Schritt werden die Sekundärstrukturen ausgebildet, die sich auf – von einzelsträngigen Bereichen unterbrochene – intramolekulare Basenpaarungen beschränken. Die Sekundärstrukturfaltung wird von allen Parametern unterstützt, die eine Abschirmung der negativen Ladungen des Zuckerphosphatrückgrats zur Folge haben – wie z. B. monovalente Kationen oder basische Proteine. Im nächsten Schritt wird die Tertiärstruktur, wie die räumliche Struktur einer RNA bezeichnet wird, gebildet. Hierbei treten in der Sequenz entfernte Bereiche einer RNA über schwache Wechselwirkungen (van der Waals Kräfte, hydrophobe Wechselwirkungen und entropische Effekte) oder auch Basenpaarung in Kontakt. Die Ausbildung einer Tertiärstruktur ist in hohem Maße von divalenten Kationen – insbesondere Mg^{2+} -Ionen – abhängig. Sie wird insgesamt durch vier Parameter bestimmt: 1. von der RNA Sequenz, 2. von der Identität, der an der Faltung beteiligten zweiwertigen Kationen, 3. von der Konzentration der zweiwertigen Kationen und 4. von RNA-bindenden Proteinen, die bei der Faltung anwesend sind (zur Übersicht siehe [121]).

Das am besten untersuchte Beispiel für die Beteiligung von Mg^{2+} -Ionen an der Ausbildung von Tertiärstrukturen sind tRNAs, die sechs Mg^{2+} -Ionen sehr stark binden und für ihre Tertiärstruktur benötigen. Mg^{2+} -Ionen können – wie alle zweiwertigen Kationen – unspezifisch und spezifisch an RNAs binden. Die Wechselwirkung wird in fast allen Fällen über die Hydrathülle des Ions vermittelt. Selten findet man die direkte Koordination eines Liganden an ein Ion. Die Bindungsvarianten – spezifisch/unspezifisch – unterscheidet man anhand des Umfangs der Hydrathülle der Ionen. Die unspezifische Bindung führt zu einer diffusen Verteilung der Mg^{2+} -Ionen um die RNA herum, die von Coulomb'schen Wechselwirkungen mit dem anionischen Feld des Zuckerphosphatrückgrats vermittelt wird. Diese Bindung beschränkt sich auf vollhydratisierte Ionen und das Zuckerphosphatrückgrat und wird als „Outersphere-complex“ bezeichnet. Die spe-

zifische Bindung von Mg^{2+} -Ionen an RNA erfolgt durch starke lokale, anionische Felder – sogenannte Mg^{2+} -Bindetaschen, die an bestimmten Bereichen der RNA entstehen. Bei diesen Bereichen handelt es sich um von der RNA ausgebildete Strukturen, wie z. B. Loops [105, 106]. Das am besten charakterisierte Beispiel ist der Anticodonloop der tRNA^{Phe}, bei dem ein Mg^{2+} -Ion fest in den Loop gebunden und dadurch die Loopgeometrie stabilisiert wird. Das Mg^{2+} -Ion hat bei einer solchen Bindung nur noch seine unmittelbare Hydrathülle, was als „Innersphere-complex“ bezeichnet wird [89].

Die Untersuchung von Bindestellen für Mg^{2+} -Ionen ist nicht ganz einfach, da das Ion keine für die Spektroskopie ausnutzbaren Eigenschaften hat. Im Fall der tRNA kann man die Bindung des Mg^{2+} -Ions durch die Fluoreszenzänderung einer modifizierten Base beobachten. Meistens muß man aber auf andere Ionen als Ersatz zurückgreifen. In der Röntgenstrukturanalyse kann man Mg^{2+} -Ionen nur schwer von hydratisierten Na^+ -Ionen unterscheiden, da sie etwa die gleiche Elektronendichte haben. Daher verwendet man hier als Ersatz oft Mn^{2+} -Ionen, die Mg^{2+} -Ionen sehr ähnlich sind und sie auch in vielen Fällen funktional ersetzen können. Bei NMR-Untersuchungen ist Magnesium wegen seines Spins $I = 5/2$ ebenfalls nur schwer detektierbar. Zwar sind kinetische Untersuchungen über die Austauschrate an Bindestellen möglich, zur Lokalisation der Bindestellen wird aber meistens Cobalthexamin verwendet [31].

Neben den spektroskopischen Methoden kann man auch indirekte Hinweise auf Bindestellen durch eine pH-abhängige, spezifische Spaltung von RNA durch zweiwertige Ionen erhalten. Diese Methode liefert zwar in erster Linie die von gebundenen Ionen verursachten Spaltstellen auf einer RNA, sie können aber Rückschlüsse auf die Bindestelle des spaltenden Ions erlauben. Für verschiedene RNA-Spezies wurde diese Methode bereits erfolgreich angewendet: das Hepatitis- δ -Ribozym [99], ribosomale RNAs [120, 170], Gruppe I Introns [156], das Hammerkopf-Ribozym [33] und die RNase P aus *E. coli* [18].

1.6 Aufgabenstellung

Die chloroplastenkodierte *psbA* mRNA wird im Laufe der Blattentwicklung stabilisiert. In jungen Blättern hat die mRNA eine Halbwertszeit von 4,5 h und in reifen Blättern eine von 10 h [77]. Es konnte gezeigt werden, daß *in vitro* diese Stabilisierung der *psbA* mRNA ein genspezifisches Profil in Abhängigkeit von der freien Mg^{2+} -Konzentration zeigt. Die Konzentrationen an freien Mg^{2+} -Ionen, bei denen die *psbA* mRNA instabil (3–4 mM) bzw. stabil (8–10 mM) ist, entspricht dabei den Verhältnissen, die man im jungen (4 mM) bzw. reifen (>10 mM) Chloroplasten findet [67]. Das deutet auf einen direkten, stabilisierenden Effekt der Mg^{2+} -Ionen auf die *psbA* mRNA hin. Es gibt keine Hinweise darauf, daß Proteine an der Vermittlung der Stabilität der mRNA direkt beteiligt sind.

Auf diesen Ergebnissen aufbauend sollte in dieser Arbeit die Wechselwirkung der *psbA* mRNA mit Mg^{2+} -Ionen charakterisiert werden, um Hinweise auf den Mechanismus der Stabilisierung der *psbA* mRNA durch Mg^{2+} -Ionen zu erhalten. Es sollten dazu die Mg^{2+} -Bindestellen auf der *psbA* mRNA lokalisiert und ihre Abhängigkeit von der RNA-

Struktur untersucht werden. Da die *psbA* mRNA mit 1247 nt zu lang für thermodynamische Untersuchungen ist, sollten außerdem Sequenzbereiche, die an der Wechselwirkung mit Mg^{2+} -Ionen beteiligt sind, identifiziert und in Bezug auf ihre Struktur analysiert werden. Daraus ergab sich als Programm für diese Arbeit:

- Die Auswahl von Sequenzabschnitten der *psbA* mRNA für die thermodynamische und biochemische Bearbeitung aufgrund bekannter Daten und theoretischer Analysen (Energienlandschaft und Sekundärstrukturvorhersage mittels Energieminimierungsalgorithmus)
- Die thermodynamische Analyse der ausgewählten RNA-Fragmente unter verschiedenen Ionenbedingungen (Temperaturgradientengelelektrophorese (TGGE) und optische Denaturierungskurven)
- Die chemische Sekundärstrukturanalyse der RNA-Fragmente durch Modifizierung mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) unter verschiedenen Ionenbedingungen
- Die Lokalisation der Bindestellen für zweiwertige Kationen auf der *psbA* mRNA und Bestimmung der strukturellen Anforderungen durch spezifische Hydrolyse von RNA durch Pb^{2+} -Ionen
 - Der Vergleich der Pb^{2+} -Spaltpmuster 5'-seitig verkürzter *in vitro* Transkripte der *psbA* mRNA
 - Die Etablierung der spezifischen Hydrolyse von RNA mit Pb^{2+} -Ionen *in organello* zur Analyse der endogenen mRNA
- Die Detektion von potentiellen *long range* Strukturelementen durch UV-Quervernetzungsexperimente

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte ein *long range* Strukturelement zwischen 5'- und 3'-Ende der *psbA* mRNA charakterisiert werden, das von der thermodynamisch optimalen Sekundärstruktur vorhergesagt wird und für dessen Ausbildung in der *psbA* mRNA es bereits einige experimentelle Hinweise gab [143]. Ziel sollte es ein, das Auftreten dieses Elements in der Struktur der *psbA* mRNA zu zeigen, sowie die Struktur dieses *long range* Strukturelements und seine Wechselwirkung mit Mg^{2+} -Ionen zu analysieren. Dabei sollte als Referenz ein 3'-seitig verkürztes Transkript der *psbA* mRNA, das sich im wesentlichen wie das Vollängentranskript verhält, aber leichter zu synthetisieren ist, benutzt werden. Auf der Grundlage der bekannten Daten und der Sekundärstrukturvorhersage ergab sich folgendes Vorgehen:

- Design und Synthese des Minimalkonstrukts des *long range* Strukturelements
- Thermodynamische Analysen des Minimalkonstrukts unter verschiedenen Ionenbedingungen (TGGE und optische Denaturierungskurven)

- Chemische Sekundärstrukturanalyse des Minimalkonstrukts durch Modifikation mit DEPC im Vergleich mit dem 3'-seitig verkürzten *in vitro* Transkript (-86/+822)
- Analyse der Bindestellen für zweiwertige Kationen auf dem Minimalkonstrukt durch spezifische Hydrolyse mit Pb^{2+} -Ionen

2 Material & Methoden

2.1 Allgemeines

Für alle Lösungen und Puffer wurde hochreines Milli-Q-Wasser (MILLIPORE WATERS, Neu Isenburg) verwendet. Es entspricht der Qualität *aqua bidestillata* und wird im weiteren nur als H₂O bezeichnet. Die verwendeten Chemikalien wurden von gängigen Herstellern bezogen und haben den Reinheitsgrad *pro analysi*, sofern es nicht anders angegeben ist.

2.1.1 Häufig verwendete Puffer und Lösungen

Die verwendete Polyacrylamidlösung - im folgenden kurz als PAA bezeichnet - enthielt insgesamt 30 % Polyacrylamid, das ein Verhältnis von 30:0,8 Acrylamid zu Bisacrylamid hatte. Für Sequenziergele (2.3.1.2) wurde eine 40 %ige Polyacrylamidlösung verwendet, die einen Vernetzungsgrad von 20:1 hatte. Die Lösungen wurden vor Gebrauch mindestens 1 Stunde mit Amberlite MB3 Ionenaustauschersalz (ICN BIOCHEMICALS INC.) gerührt, das danach durch Filtrieren entfernt wurde.

Die hier aufgeführten Puffer wurden häufig verwendet und werden im weiteren nicht mehr näher beschrieben:

TBE-Puffer (10×)		TE-Puffer (1×)		TB-Puffer (5×)	
Tris	890 mM	Tris/HCl pH 8.0	10 mM	Tris	445 mM
Borsäure	890 mM	EDTA	1 mM	Borsäure	gesättigt
EDTA	25 mM				

Folgender Auftragspuffer (kurz: AP) wurde verwendet:

Formamid-AP

Formamid	90 %
EDTA	5 mM
Bromphenolblau	45 µl/ml
Xylencyanol	45 µl/ml

2.1.2 Nukleinsäuren

2.1.2.1 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide, die für die PCR (2.2.2.1), Sequenzierung (2.4.1) und Primer Extension (2.4.2) verwendet wurden, wurden von der Firma THERMOHYBAID (früher INTERACTIVA), Ulm, bezogen. Die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide sind in Anhang A.1 aufgeführt. Die Oligonukleotide wurden von THERMOHYBAID lyophilisiert geliefert und in einem den Herstellerangaben entsprechenden Volumen H₂O aufgenommen. Im weiteren werden die Begriffe „Oligonukleotid“ und „Primer“ synonym verwendet.

2.1.2.2 Verwendete Plasmide

Für die PCR (2.2.2.1) und die Sequenzierung (2.4.1) wurden als Template die in der Tabelle aufgeführten Plasmide verwendet, die freundlicherweise von Frau PD Dr. Petra Wolff zur Verfügung gestellt wurden. Als Vektor wurde in allen Fällen pSK benutzt. Weitere Angaben zur Sequenz und den Schnittstellen der Restriktionsenzyme finden sich in Anhang A.2. Die Sequenzpositionen sind nach Zurawski *et al.* [176] relativ zum Startcodon angegeben.

Plasmid	Positionen im Gen	Restriktionsenzyme
pSK	+255 bis +1026	Pst I - Xba I
pSK	+255 bis +504	Pst I - Hind III
pSK	+504 bis +1026	Hind III - Xba I
pSK	-120 bis +1026	Hinc II - Xba I
pSK	+1026 bis +1185	Xba I - Hind III

Für die Herstellung des DNA-Längenstandards (2.1.5) wurde das Plasmid pBR322 freundlicherweise von Herrn Bernd Esters zur Verfügung gestellt.

2.1.3 Fällung von Nukleinsäuren

2.1.3.1 Natriumacetat/Ethanol Fällung

Um Nukleinsäuren aus einer Lösung aufzukonzentrieren oder umzupuffern, kann man sie durch Zugabe von Salz und Ethanol ausfällen. Zu dem zu fällenden Ansatz wurden 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat und 3 Volumen Ethanol (96 %; pharma. rein) gegeben und das Gemisch für 45–60 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das ausgefallene Nukleinsäuresalz durch Zentrifugation für 45–60 Minuten bei 20 000–25 000 × g und 4 °C pelletiert. Das Pellet wurde mit 70 %igem Ethanol (v/v) gewaschen, durch Zentrifugation erneut pelletiert und anschließend luftgetrocknet. Das Pellet wurde je nach weiterer Verwendung in einem geeigneten Volumen H₂O oder 1× TE aufgenommen.

2.1.3.2 Ammoniumacetat/Ethanol Fällung

Um bei der Fällung radioaktiv markierter *in vitro* Transkripte und Oligonukleotide die nicht eingebauten radioaktiven Nukleotide nicht mit auszufällen, wurde statt Natriumacetat Ammoniumacetat verwendet. Zu dem zu fällenden Ansatz wurden 0,5 Volumen 7,5 M Ammoniumacetat und 3 Volumen Ethanol (96 %; pharma. rein) gegeben und das Gemisch für 45–60 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das ausgefallene Nukleinsäuresalz durch Zentrifugation für 45–60 Minuten bei $20\,000\text{--}25\,000 \times g$ und 4°C pelletiert. Das Pellet wurde mit 70 %igem Ethanol (v/v) gewaschen, durch Zentrifugation erneut pelletiert und anschließend luftgetrocknet. Das Pellet wurde je nach weiterer Verwendung in einem geeigneten Volumen H_2O oder $1 \times \text{TE}$ aufgenommen.

2.1.4 Phenol/Chloroform Extraktion

Die Phenol/Chloroform Extraktion dient der Abtrennung von Proteinen von Nukleinsäuren wie es bei der Präparation von Gesamt-RNA aus pflanzlichen Geweben (z. B. RNA-Präparation aus Chloroplasten; 2.3.5.2) oder der Aufreinigung von Nukleinsäuren nach enzymatischen Reaktionen (z. B. Dephosphorylierung (2.2.2.2), Restriktionsverdau (2.1.5) ect.) notwendig ist.

Die Proben wurden mit 1 Volumen TE-gesättigtem Phenol (ROTH) versetzt, gründlich durchmischt und die Phasen durch eine Zentrifugation für 5 Minuten bei $20\,000\text{--}25\,000 \times g$ getrennt. Die wässrige Phase, die die Nukleinsäuren enthält, wurde abgenommen und mit 1 Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1, v/v) versetzt. Die Phasen wurden nochmals gründlich durchmischt und durch Zentrifugation getrennt. Die wässrige Phase wurde abgenommen und die Nukleinsäuren mit Natriumacetat/Ethanol gefällt (2.1.3.1).

2.1.5 Herstellung eines Nukleinsäure-Längenstandards

Bei verschiedenen gelelektrophoretischen Auftrennungen wurde zur Abschätzung der Länge der Nukleinsäuren ein DNA-Längenstandard verwendet. Der Längenstandard wurde durch einen Restriktionsverdau des Plasmids pBR322 mit dem Restriktionsenzym *HinfI* hergestellt.

Restriktionsansatz

pBR322	50 μg
Spermidin	1 mM
Puffer H (10 \times ; ROCHE)	1 \times
<i>HinfI</i> (ROCHE)	24 U
H_2O	ad 80 μl

Der Restriktionsansatz wurde über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Nukleinsäure Phenol/Chloroform extrahiert (2.1.4) und Natriumacetat/Ethanol gefällt (2.1.3.1).

2.2 Präparative Methoden

2.2.1 Isolation von Chloroplasten

2.2.1.1 Aufzucht

Spinatpflanzen der Gattung *Spinacea oleracea* cv Monnopa wurden in einem beschattungs- und temperaturregulierten Gewächshaus angezogen. Die Temperatur lag normalerweise zwischen 20 °C und 25 °C. Die Pflanzen wurden automatisch beschattet, wenn die Lichtintensität über 50 000 lux lag. Von Oktober bis Februar wurden durch eine zusätzliche Beleuchtung mit Hochdruck-Natriumdampflampen (PHILIPS SON-T 400) Langtagbedingungen (14 h Licht) gewährleistet. Die Pflanzen wurden in TKS1-Anzucherde ausgesät und nach Erscheinen der ersten Folgeblätter (etwa nach 10 Tagen) in TKS2-Pflanzerde pikiert.

2.2.1.2 Isolation intakter Chloroplasten

Für eine Chloroplastenisolation wurden 200–300 g voll ausgereifte Spinatblätter geerntet. Alle weiteren Schritte der Präparation wurden bei 4 °C ausgeführt. Das Blattmaterial wurde mit H₂O gewaschen und mit einer handelsüblichen Salatschleuder getrocknet. Je etwa 50 g wurden mit 200 ml 1× HEPES/Sorbitol im Waring-Blender homogenisiert (3× kurz Stufe „low“; 3× kurz Stufe „high“). Das Homogenat wurde über vier Lagen Miracloth (CALBIOCHEM) filtriert und in Zentrifugen-Rundbodenbechern im Rotor JA14 (BECKMAN) 1 Minute bei 6000 rpm in der Zentrifuge J2-21 (BECKMAN) zentrifugiert. Die Pellets wurden in einem Gesamtvolumen von maximal 40 ml mit einem weichen Pinsel resuspendiert. Die Chloroplastensuspension wurde gleichmäßig auf vier Percollgradienten (10 % bis 80 % Percoll), die jeweils ein Volumen von 34 ml hatten, verteilt. Die Gradienten wurden für 25–30 Minuten im Rotor JS7.5 (BECKMAN) bei 7000 rpm in der Zentrifuge J2-21 (BECKMAN) zentrifugiert. Die intakten Chloroplasten bandieren dabei unterhalb den bereits lysierten. Die intakten Chloroplasten wurden mit einer Pipette geerntet, auf zwei Glaszentrifugenbecher verteilt und zweimal mit 1× HEPES/Sorbitol gewaschen, wobei die Chloroplasten jeweils durch Zentrifugation in der Untertischzentrifuge (HERÄUSCHRIST) für 1 Minute bei 5000 rpm pelletiert wurden. Nach dem letzten Waschschritt wurden die Pellets in 4–5 ml 1× HEPES/Sorbitol resuspendiert und die Proteinkonzentration nach Bradford (2.2.1.3) bestimmt.

5× HEPES/Sorbitol

Sorbit	300,6 g
HEPES	59,58 g
H ₂ O	ad 1 l

HEPES und Sorbit wurden zunächst in einem kleineren Volumen H₂O gelöst und mit 5 M KOH auf pH 7.9 eingestellt. Auf 1 l 1× HEPES/Sorbitol wurden frisch 700 µl β-Mercaptoethanol hinzugefügt.

PCBF-Lösung		Gradienten-Lösung	
PEG 6000	3 g	5× HEPES/Sorbitol	20 ml
BSA	1 g	PCBF-Lösung	10 bzw. 80 ml
Ficoll 70	1 g	β -Mercaptoethanol	80 μ l
Percoll	ad 100 ml	H ₂ O	ad 100 ml

2.2.1.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Der Proteingehalt der isolierten Chloroplasten wurde nach Bradford bestimmt [16]. Der Nachweis beruht auf der Änderung des Absorptionsmaximum des Farbstoffes Coomassie Brilliantblau von 465 nm auf 595 nm in Gegenwart von Proteinen. Um die Absorptionsänderung mit einer Proteinmenge zu korrelieren, wurde eine Eichreihe mit definierten Mengen BSA (bovines Serumalbumin) verwendet. Mit dieser Methode können 0,2–2 μ g Protein nachgewiesen werden. Zu 20 μ l Probe wurden 50 μ l 1 M Natronlauge und 1 ml Bradford-Reagenz gegeben. Nach einer 5 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 595 nm gemessen.

Bradford-Reagenz

Serva Blue G	100 mg
Phosphorsäure	100 ml
Ethanol	50 ml
H ₂ O	ad 1 l

2.2.2 Herstellung der verwendeten *in vitro* Transkripte

2.2.2.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion ermöglicht es in kurzer Zeit eine große Anzahl Kopien einer DNA-Matrize herzustellen. Diese Methode basiert auf der zyklischen Abfolge von thermischer Denaturierung einer Template-DNA, Hybridisierung von Primern an die Matrize und Verlängerung der Primer durch eine thermostabile DNA-abhängige DNA-Polymerase.

Die PCR wurde hier zur Synthese der Template-DNA für spätere *in vitro* Transkriptionen benutzt, daher enthielten alle verwendeten 5' Primer die Sequenz des T7-Promotors an ihrem 5'-Ende. Als Template-DNA für die PCR wurden Plasmide (2.1.2) oder Gesamt-DNA aus isolierten Chloroplasten verwendet, die freundlicherweise von Frau PD Dr. Petra Wolff zur Verfügung gestellt wurden. Die verwendeten Primer und die synthetisierten Produkte sind in der folgenden Tabelle aufgelistet. Die vollständigen Sequenzen finden sich in Anhang A.1. Die angegebenen Positionen beziehen sich auf Zurawski *et al.* ([176]; siehe dazu auch Anhang A.2).

synthetisierte Sequenz	5' Primer	3' Primer
-86 bis +37	T7(-86/-60)	(+37/+18)
-86 bis +131	T7(-86/-60)	(+131/+111)
-86 bis +822	T7(-86/-60)	(+822/+801)
-15 bis +822	T7(-15/+8)	(+822/+801)
+18 bis +822	T7(+18/+37)	(+822/+801)
+115 bis +822	T7(+115/+134)	(+822/+801)
+962 bis +1161	T7(+962/+984)	(+1161/+1138)
Minimalkonstrukt	T7(-86/-60)	Oligo 2 (Mini)

Reaktionsansatz PCR

Template-DNA (Plasmid 50 ng bzw. ctDNA 200 ng)	
dNTPs (10 mM)	2 µl
5' Primer (10 pmol/ µl)	2 µl
3' Primer (10 pmol/ µl)	2 µl
MgCl ₂ (25 mM; PROMEGA)	6 µl
Taq-Polymerase Puffer (10×; PROMEGA)	10 µl
Taq-Polymerase (5 U/ µl; PROMEGA)	0,4 µl
H ₂ O	ad 100 µl

Die Ansätze wurden mit 100 µl Paraffinöl überschichtet, um ein Verdunsten der Proben zu verhindern. Die PCR wurde in einem Thermocycler der Firma LANDGRAF durchgeführt. Für alle Primerpaare wurde folgender Temperaturzyklus gewählt:

PCR-Programm

Zyklenanzahl	1×		35×		1×	
Denaturierung	94 °C	120 sec	94 °C	60 sec	94 °C	60 sec
Hybridisierung	50 °C	90 sec	50 °C	90 sec	50 °C	90 sec
Polymerisation	72 °C	120 sec	72 °C	120 sec	72 °C	240 sec

Die PCR-Produkte wurden anschließend mit dem *QIAquick PCR Purification Kit* von QIAGEN nach Vorschrift aufgereinigt [122].

2.2.2.2 Herstellung von Guanylyl-(5'-3')-Guanosin (GpG)

Guanylyl-(5'-3')-Guanosin (GpG) kann als zusätzliches Nukleotid bei *in vitro* Transkriptionen zugesetzt werden. Es wird von der T7-Polymerase bevorzugt eingebaut. Allerdings kann es nur am 5'-Ende eines Transkriptes vorkommen, da es keine 5'-Phosphatgruppe hat. Diese Eigenschaft erlaubt eine Phosphorylierung des Transkriptes mit γ -³²P-ATP, ohne vorher zu dephosphorylieren.

Zur Herstellung von GpG wurden 10 mg Poly-Guanosin (SIGMA) in 2 ml H₂O gelöst und 120 µl 5 M KOH dazu gegeben. Der Ansatz wurde 45 Minuten bei 60 °C inkubiert. Die Hydrolyse wurde durch Zugabe von 500 µl 1 M Tris/HCl, pH 6.5 und 100 µl 1 M HCl gestoppt und der Ansatz mit 5 Volumen eines Ethanol/Aceton Gemisches (1:1, v/v) über

Nacht bei -20°C gefällt. Am nächsten Tag wurde die Nukleinsäure durch Zentrifugation für 1 Stunde bei $20\,000\text{--}25\,000 \times g$ und 4°C pelletiert. Die Pellets wurden lyophilisiert und in $200\ \mu\text{l}$ $10\ \text{mM}$ Tris/HCl, pH 8.0 und $1\ \text{mM}$ ZnCl_2 (frisch angesetzt) aufgenommen. Um von den entstandenen pGpG-Fragmenten die endständige Phosphatgruppe abzuspalten, wurden $200\ \text{U}$ alkalische Phosphatase CIP (ROCHE) dazugegeben, 1 Stunde bei 37°C und eine weitere Stunde bei 45°C inkubiert. Die Ansätze wurden Phenol/Chloroform extrahiert (2.1.4) und mit 0,1 Volumen NaCl und 5 Volumen Ethanol/Aceton (1:1, v/v) über Nacht gefällt. Die Pellets wurden in $600\ \mu\text{l}$ $50\ \text{mM}$ Tris/HCl, pH 8.0 aufgenommen und die Nukleinsäure-Konzentration spektralphotometrisch bestimmt (2.2.2.6).

2.2.2.3 In vitro Transkription

Für die Analyse der RNA-Sekundärstrukturen wurden radioaktiv markierte und unmarkierte *in vitro* Transkripte, deren Sequenz unterschiedlich langen Fragmenten der *psbA* mRNA oder dem Minimalkonstrukt (2.2.2.1, Anhang A.2) entsprach, verwendet. Als DNA-Template für die *in vitro* Transkription wurden PCR-Produkte benutzt (2.2.2.1), die am 5'-Ende einen T7-Promotor enthielten. Dadurch war es möglich, die entsprechenden Sequenzen mit der T7-RNA-Polymerase zu transkribieren.

Die radioaktive Markierung wurde durch Phosphorylierung von *in vitro* Transkripten am 5'-Ende mit $\gamma\text{-}^{32}\text{P}\text{-ATP}$ realisiert (2.2.2.4). Dazu wurden nicht-radioaktive Transkripte in Gegenwart von GpG (2.2.2.2) synthetisiert. Der Einbau von GpG kann bei vollständigen Transkripten nur in der ersten Position vorkommen, da GpG keine 5'-Phosphatgruppe besitzt. Die fehlende 5'-Phosphatgruppe erlaubt eine Phosphorylierung mit $\gamma\text{-}^{32}\text{P}\text{-ATP}$, ohne vorher zu dephosphorylieren. Diese 5'-endmarkierten Transkripte wurden für die Strukturuntersuchungen (siehe 2.3.5.1 und 2.3.6) verwendet.

Die unmarkierten Transkripte wurden für die thermodynamischen Analysen (2.3.1.3 und 2.3.3), die UV-Verknüpfungsexperimente (2.3.2) und für Pb^{2+} -Spaltungen, die durch Primer Extension (2.4.2) analysiert wurden, verwendet.

Die Transkriptionsansätze setzten sich wie folgt zusammen:

	5'-GpG	unmarkiert
Template (Plasmid/PCR-Produkt)	0,5 μg / 100 ng	0,5 μg / 100 ng
Puffer IVT A	10 μl	10 μl
Puffer IVT B	10 μl	10 μl
rNTPs (5 mM)	10 μl	10 μl
RNAsin (40 U/ μl)	1 μl	1 μl
T7-Polymerase (60 U/ μl)	2 μl	2 μl
GpG (10 mM)	ad 50 μl	-
H ₂ O	-	ad 50 μl

IVT A (5 \times): $100\ \text{mM}$ Na_2HPO_4 , pH 7.7; $50\ \text{mM}$ DTT

IVT B (5 \times): $40\ \text{mM}$ MgCl_2 ; $20\ \text{mM}$ Spermidin/HCl pH 7.7

Die T7-Polymerase wurde im Haus präpariert und freundlicherweise von Bernd Esters zur Verfügung gestellt, das RNAsin wurde von PROMEGA bezogen. Die Ansätze wurden 4 Stunden bei 37°C inkubiert, wobei nach 2 Stunden zu jedem Ansatz weitere 2 µl T7-Polymerase dazugegeben wurden. Die Ansätze wurden anschließend Natriumacetat/Ethanol gefällt (2.1.3.1) und durch eine Gelelution weiter aufgereinigt (2.2.2.5).

2.2.2.4 Radioaktive 5'-Endmarkierung durch γ - Phosphorylierung

Die GpG *in vitro* Transkripte (2.2.2.3) und Oligonukleotide (2.1.2) wurden nach dem gleichen Protokoll radioaktiv 5'-endmarkiert. Das GpG am 5'-Ende der *in vitro* Transkripte führt zu einem freien 5' OH-Ende und erlaubt die direkte Phosphorylierung mit γ -³²P-ATP durch eine Polynukleotidkinase (PNK). Die Oligonukleotide wurden nach der Phosphoramidit-Methode synthetisiert, daher besitzen sie eine 5' OH-Gruppe und können ebenfalls direkt phosphoryliert werden.

Phosphorylierungsansatz

GpG-Transkript (2–5 µg) oder Oligonukleotid (10 pmol) + H ₂ O	3 µl
PNK-Puffer (10×; ROCHE)	2 µl
T4 PNK (10 U/µl; ROCHE)	1 µl
γ - ³² P-ATP (5000 Ci/mmol)	5 µl

Die Phosphorylierungsansätze mit GpG-Transkripten wurden 2 Stunden bei 37°C inkubiert, wobei nach 1 Stunde erneut PNK zugegeben wurde, und anschließend Ammoniumacetat/Ethanol gefällt (2.1.3.2). Die Ansätze mit den Oligonukleotiden wurden über Nacht bei 4°C inkubiert, Ammoniumacetat/Ethanol gefällt und in einem geeigneten Volumen 1× TE resuspendiert. Die markierten Transkripte wurden ein weiteres Mal geleliert (2.2.2.5).

2.2.2.5 Aufreinigung von Nukleinsäuren durch Gelelution

Für die sich anschließenden Untersuchungen war es notwendig, die verwendeten *in vitro* Transkripte nach der Transkription bzw. Markierung aufzureinigen, da die T7-Polymerase häufig längere Transkripte produziert oder es je nach Transkript und Template verstärkt zu Abbrüchen kommen kann.

Der *in vitro* Transkriptionsansatz wurde hierzu vollständig in einer denaturierenden Gelelektrophorese aufgetrennt (2.3.1.1). Radioaktiv endmarkierte Transkripte wurden im Gel durch kurze Exposition eines Röntgenfilms (KODAK X-omatAR) detektiert. Zur Detektion der unmarkierten Transkripte wurde das Gel 15 Minuten in einer Ethidiumbromidlösung (2 µl/ml) inkubiert. Ethidiumbromid interkaliert zwischen die Basen von Nukleinsäuren und zeigt dann eine 20fach verstärkte Fluoreszenz bei Anregung mit UV-Licht, so daß die Banden unter UV-Licht sichtbar werden.

Die so detektierten Banden wurden ausgeschnitten und in 300 µl Elutionspuffer überführt und zur Elution der Nukleinsäuren über Nacht bei 4°C geschüttelt. Das Eluat

Elutionspuffer

H ₂ O	270 µl
3 M NaOAc, pH 6.0	30 µl
0,2 M EDTA	1,5 µl
10 % SDS (w/v)	3 µl

wurde von den Gelstücken abgenommen und durch Zugabe von 900 µl Ethanol (96 %; pharm. rein) gefällt (2.1.3.1). Die Konzentration der Transkripte wurde im Falle der radioaktiv endmarkierten Transkripte mit einer Cerenkov-Zählung in einem Szintillationszähler (BECKMAN LS 5000 TD) quantifiziert. Die Konzentration der unmarkierten Transkripte wurde spektralphotometrisch bestimmt (2.2.2.6).

2.2.2.6 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration der Nukleinsäuren wurde spektralphotometrisch bestimmt (Spektralphotometer BECKMAN DU 640). Zwischen gemessener Absorption und Nukleinsäurekonzentration besteht folgende Beziehung [135]:

$$\begin{aligned} \text{RNA} \quad 1 A_{\lambda=260 \text{ nm}} &= 40 \mu\text{g/ml} \\ \text{DNA} \quad 1 A_{\lambda=260 \text{ nm}} &= 50 \mu\text{g/ml} \end{aligned}$$

Für die Konzentrationsbestimmung des GpG wurde folgende Gleichung benutzt:

$$A = \varepsilon_{(\text{GTP})} \times d \times c \quad (2.1)$$

$$\varepsilon_{(\text{GTP})} = 13,7 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1} \quad d = 1 \text{ cm} \quad c = \text{Konzentration von GpG}$$

2.2.3 Herstellung des Minimalkonstrukts

Das Minimalkonstrukt soll bei einer Größe von maximal 200 nt eine Struktur der *psbA* mRNA simulieren, die von weit auseinanderliegenden Sequenzbereichen ausgebildet wird. Um die gewünschten Sequenzbereiche auf einen DNA-Strang zu kodieren, wurde das „Baukastensystem“ verwendet, dessen Prinzip in Abbildung 2.1 schematisch dargestellt ist. Dabei werden zwei oder mehr DNA-Stränge, die die Zielsequenzen tragen, über sogenannte Linker-Oligonukleotide verbunden. Ein Linker-Oligonukleotid ist etwa zur Hälfte jedem der beiden DNA-Stränge, die es verbinden soll, komplementär, so daß es an beide Stränge hybridisieren kann und so das 3'-Ende des einen Stranges in die Nähe des 5'-Ende des anderen Stranges bringt. Die so verbundenen Stränge lassen sich durch eine Ligase ligieren und das Endprodukt kann mittels PCR amplifiziert werden. Die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide und des Minimalkonstruktes finden sich in Anhang A.3.

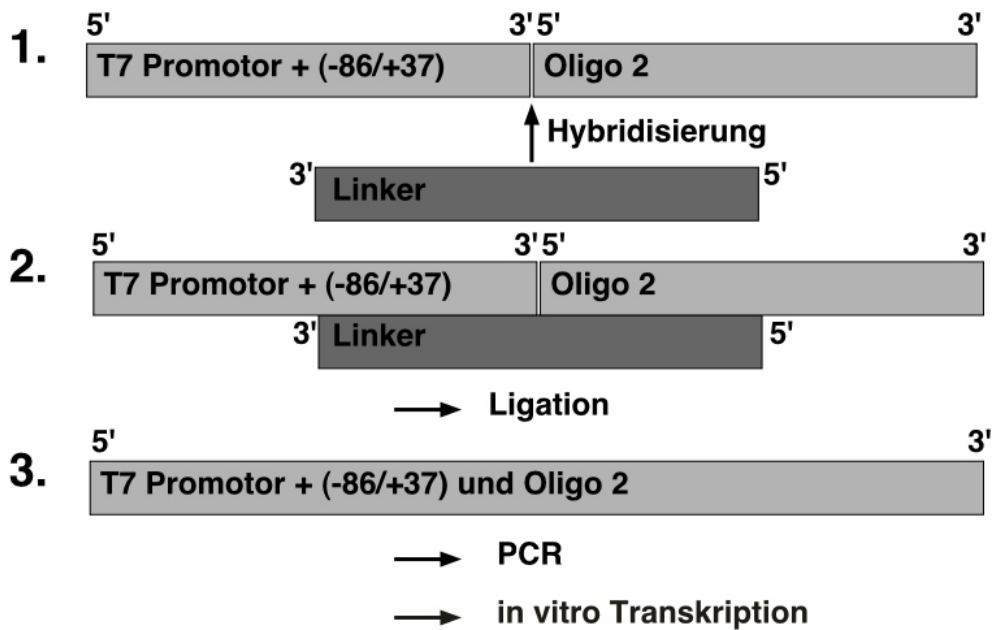


Abbildung 2.1: **Synthese des psbA Minimalkonstrukts nach dem Baukastensystem**
 Im 1. Schritt wird das Linker-Oligonukleotid an die Oligonukleotide 1 und 2 hybridisiert. Im 2. Schritt werden die Oligonukleotide 1 und 2 ligiert. Im 3. Schritt wird das ligierte Molekül mittels PCR amplifiziert und *in vitro* transkribiert.

2.2.3.1 Asymmetrische PCR des Oligonukleotids 1

Der für die Hybridisierung benötigte DNA-Strang des PCR-Produkts (-86/+37) mußte zunächst durch eine asymmetrische PCR im Überschuß hergestellt werden. Hierzu wurde der unter 2.2.2.1 beschriebene Reaktionsansatz gewählt. Allerdings enthielt der PCR-Ansatz nur **einen** Primer: T7(-86/-60). Die PCR wurde nach dem oben aufgeführten PCR-Programm amplifiziert. Das PCR-Programm wurde, da eine asymmetrische PCR keine exponentielle Amplifikation ermöglicht, auf 60 Zyklen verlängert, um sicherzustellen, daß eine ausreichende Menge des DNA-Strangs synthetisiert wird. Das PCR-Produkt wurde mit dem *QIAquick PCR Purification Kit* von QIAGEN nach Vorschrift [122] aufgereinigt und anschließend Natriumacetat/Ethanol gefällt (2.1.3.1).

2.2.3.2 Phosphorylierung des Oligonukleotids 2

Das Oligonukleotid 2 hatte aufgrund seiner Synthese nach der Phosphoramidit-Methode am 5'-Ende eine OH-Gruppe. Um eine Ligation zu ermöglichen, mußte das Oligonukleotid daher zunächst phosphoryliert werden.

Phosphorylierungsansatz

Oligonukleotid 2	10 pmol
ATP	500 pmol
PNK-Puffer (10×; PROMEGA)	1×
T4 PNK (10 U/ µl; PROMEGA)	1,6 µl
H ₂ O	ad 30 µl

Der Ansatz wurde 1 Stunde bei 37 °C inkubiert und dann Natriumacetat/Ethanol gefällt (2.1.3.1). Das Pellet wurde in 8 µl 1× TE resuspendiert und hatte damit – unter Annahme von 20 % Verlust – eine Endkonzentration von 1 pmol/ µl.

2.2.3.3 Hybridisierung

Für eine effiziente Hybridisierung wurden alle Oligonukleotide äquimolar eingesetzt. Der Hybridisierungsansatz wurde in ein 95 °C heißes Wasserbad gebracht, das langsam über Nacht auf Raumtemperatur abgekühlte.

Hybridisierungsansatz

Oligonukleotid 1 (aus asym. PCR)	1 pmol
Oligonukleotid 2 (phosphoryliert)	1 pmol
Linker-Oligonukleotid	1 pmol
Hybridisierungspuffer	ad 10 µl

Hybridisierungspuffer

MgCl ₂	3 mM
Tris/HCl, pH 8.0	6 mM

2.2.3.4 Ligation

Die nach der Hybridisierung über das Linker-Oligonukleotid verbundenen Oligonukleotide 1 und 2 wurden nun mit der T4 DNA-Ligase ligiert.

Ligationsansatz

T4 DNA-Ligase (ROCHE)	5 U
ATP	1 mM
DTT	1 mM
Hybridisierungspuffer	ad 20 µl

Der Ansatz wurde über Nacht bei 14 °C im Wasserbad inkubiert. Danach wurde der Ansatz Phenol/Chloroform extrahiert (2.1.4) und Natriumacetat/Ethanol gefällt (2.1.3.1). Das Pellet wurde in 20 µl 1× TE resuspendiert und komplett in eine anschließende PCR eingesetzt. Die PCR wurde wie oben beschrieben (2.2.2.1) durchgeführt. Als Primer wurden T7(-86/-60) und der 3' PCR-Primer des Minimalkonstrukts verwendet. Das PCR-Produkt wurde vor einer weiteren Verwendung zur Herstellung eines *in vitro* Transkripts bei der Firma SEQLAB sequenziert, um die korrekte Sequenz sicherzustellen.

2.3 Biophysikalische Methoden

2.3.1 Gelelektrophorese

2.3.1.1 Denaturierende Gelelektrophorese

Die *in vitro* Transkripte und PCR-Produkte wurden denaturierend in einem 5%igen PAA-Gel (Vernetzungsgrad 30:0,8) mit 1× TBE-Puffer und 8 M Harnstoff bei einer limitierten Leistung von 45 W elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde in der Größe 20 cm × 20 cm × 0,5 mm auf die hydrophile Seite einer Gelbondfolie (SERVA) aufpolymerisiert. Die Polymerisation wurde durch Zugabe von 0,1 % (v/v) TEMED und 1 % (v/v) einer 10%igen APS-Stammlösung zur Gellösung gestartet. Für die Elution der Transkripte des Minimalkonstrukts wurde ein 7%iges PAA-Gel unter sonst gleichen Bedingungen verwendet (2.2.2.5). Für die Gelelektrophorese der UV-quervernetzten RNA wurde ein 3,5%iges PAA-Gel mit sonst gleichen Bedingungen verwendet (2.3.2). Die Transkripte wurden 1:1 in Formamid-AP aufgenommen und 3 Minuten bei 95 °C denaturiert. Um auch während der Gelelektrophorese denaturierende Bedingungen zu gewährleisten, wurde das Gel in einem 20 minütigen Vorlauf bei 45 W auf 50 °C erhitzt. Als Laufpuffer wurde entsprechend der Gelzusammensetzung 1× TBE-Puffer verwendet.

2.3.1.2 Sequenziergele

Die Nukleinsäuren aus der Sequenzierreaktion (2.4.1) und der Primer Extension (2.4.2) wurden denaturierend in einem 8%igen PAA-Gel (Vernetzungsgrad 19:1) mit 1× TBE-Puffer und 7 M Harnstoff bei einer limitierten Leistung von 100 W elektrophoretisch aufgetrennt. Die Gele hatten eine Größe von 30 cm × 40 cm × 0,5 mm. Die Polymerisation wurde durch Zugabe von 0,1 % (v/v) TEMED und 1 % (v/v) einer 10%igen APS-Stammlösung zur Gellösung gestartet. Die Proben wurden in Formamid-AP aufgenommen und 3 Minuten bei 95 °C denaturiert. Um während der Gelelektrophorese denaturierende Bedingungen zu gewährleisten, wurde das Gel in einem 30 minütigen Vorlauf bei 100 W auf 50 °C erhitzt. Als Laufpuffer wurde entsprechend der Gelzusammensetzung 1× TBE-Puffer verwendet. Für diese Gelelektrophoresen wurde die Gelkammer Model S2 von GIBCO BRL verwendet.

2.3.1.3 Temperaturgradientengelelektrophorese (TGGE)

Die Temperaturgradientengelelektrophorese (TGGE) dient der Sekundärstrukturanalyse von RNAs. Es handelt sich dabei um eine horizontale Gelelektrophorese, bei der zusätzlich senkrecht zur Elektrophoreserichtung ein Temperaturgradient angelegt wird [128]. Die Nukleinsäure wird in eine den gesamten Temperaturbereich überdeckende Tasche aufgetragen und nimmt bei der jeweiligen Temperatur die ihrem Denaturierungsverhalten entsprechende Konformation an. Je nach Konformation erfährt die Nukleinsäure in der Gelmatrix eine unterschiedliche Retardation, so daß man ein mobilitätsabhängiges

Denaturierungsprofil der Nukleinsäure erhält, das auch thermodynamische Aussagen erlaubt. Im Gegensatz zur optischen Schmelzkurve (2.3.3) erlaubt die TGGE auch eine Analyse von Nukleinsäuregemischen und kooexistierenden Konformationen.

Für die TGGEs wurden 5 oder 8 %ige PAA-Gele mit einem Vernetzungsgrad von 30:0,8 mit $0,2\times$ TB- oder TBE-Puffer, je nach Experiment bis zu 8 M Harnstoff sowie Na_2SO_4 und MgSO_4 verwendet. Die Details sind an den entsprechenden Stellen im Ergebnisteil angegeben. Die Gellösungen wurden für 5 Minuten im Eksikator entgast, um Luftblasen während der Polymerisation zu vermeiden. Die Gele wurden in der Größe $20\text{ cm} \times 20\text{ cm} \times 0,5\text{ mm}$ auf die hydrophile Seite einer Gelbondfolie (SERVA) aufpolymerisiert. Die Polymerisation wurde durch Zugabe von 0,1 % (v/v) TEMED und 0,25 % (v/v) einer 10 %igen APS-Stammlösung zur Gellösung gestartet.

Für die TGGEs wurde eine Anlage für horizontale Gelelektrophoresen der Firma QIAGEN verwendet. Die Temperierung erfolgte über zwei Wasserbäder, die die Ränder einer beschichteten Aluminiumplatte, auf der das Gel während der Elektrophorese auflag, auf die Eckpunkte des Temperaturgradienten, brachten. Die Temperaturen wurden über Pt 100 Meßfühler, die die Temperatur direkt an der Aluminiumplatte gemessen haben, reguliert. Durch die wärmeleitenden Eigenschaften der Aluminiumplatte entsteht ein linearer Temperaturgradient.

Es wurden 150 ng *in vitro* Transkript und 100 ng eines PCR-Produkts, das als Kontrolle für Anomalien der Gelmatrix diente, in $0,2\times$ TB- bzw. TBE-Puffer und 0,2 % Xylencyanol und Bromphenolblau aufgetragen und 10–15 Minuten bei der niedrigen Temperatur des Gradienten in das Gel einlaufen gelassen. Die Elektrophorese wurde spannungsgesteuert (300–500 V). Zum Anlegen des Temperaturgradienten wurde die Elektrophorese unterbrochen und erst nach Einstellung des Gradienten fortgeführt, wobei die Dauer vom jeweiligen Experiment abhing und zwischen 1 und 3 Stunden lag. Die Nukleinsäuren wurden anschließend durch Silberfärbung nachgewiesen (2.3.1.5).

2.3.1.4 Nachweis von Nukleinsäuren durch Autoradiographie

Radioaktiv markierte Nukleinsäuren wurden nach der Gelelektrophorese durch Exposition eines Röntgenfilms *X-Omat AR* von KODAK oder *Super RX* von FUJI detektiert. Die Röntgenfilme wurden je nach Stärke der radioaktiven Strahlung zwischen 6 Stunden und 1 Woche bei -70°C unter Verwendung einer Verstärkerfolie *Cronex Lighting Plus* von DUPONT exponiert.

2.3.1.5 Silberfärbung von Nukleinsäuren

Man kann Nukleinsäuren in einem PAA-Gel durch eine Färbung mit Silbernitrat (AgNO_3) sichtbar machen [140]. Die Silberionen lagern sich dabei an das negativ geladene Phosphatrückgrat der Nukleinsäuren an. Durch Reduktion der Ag^+ -Ionen mit Formaldehyd zu metallischem Silber erscheint die Nukleinsäure als braun gefärbte Bande im Gel. Die Nachweisgrenze der Silberfärbung liegt bei 0,5–1 ng pro Bande.

Fixieren	Ethanol	10 %	15 min
	Essigsäure	0,5 %	
Färben	AgNO ₃	1,9 g/l	20 min
Waschen	H ₂ O		3 × 10 s
Entwickeln	NaOH	1,5 %	5-15 min
	NaBH ₄	0,08 %	
	Formaldehyd	0,15 %	
Stoppen	NaCO ₃	7,5 g/l	10 min

2.3.2 Quervernetzung von RNA durch UV-Licht

Bestrahlt man Nukleinsäuren mit UV-Licht, werden die delokalisierten π -Elektronen der Basen angeregt. Wenn zwei Basen in geeigneter Geometrie zueinander stehen, kann es zu einer kovalenten Verknüpfung - einer Quervernetzung - kommen. Nicht-kanonische Basenpaare, die in Tertiärstrukturen oder in Loops ausgebildet werden, weisen eine besonders hohe Verknüpfungseffizienz auf [17]. Durch die Quervernetzung wird die RNA partiell zirkularisiert und kann in einer denaturierenden Gelelektrophorese durch ihre starke Retardation identifiziert werden.

Es wurden 150 ng des *in vitro* Transkripts (-86/+822) in 1 × TE und ±10 mM MgCl₂ mit UV-Licht (254 nm) für 0, 10, 30 und 60 Minuten bestrahlt. Die Proben hatten ein Envolumen von 10 µl und wurden in offenen Eppendorf-Reaktionsgefäßen in einem Eisbad in einen Stratalinker Modell 1800 der Firma STRATAGENE gestellt. Die Probe ohne UV-Bestrahlung (t = 0 min) wurde für 60 Minuten im Eisbad inkubiert. Im Anschluß an die Bestrahlung wurden die Proben mit 1 Volumen Formamid-AP versetzt, für 3 Minuten bei 95 °C denaturiert und in einer denaturierenden Gelelektrophorese aufgetrennt (2.3.1.1). Als Gelbedingungen wurden 3,5 % PAA (Vernetzungsgrad 30:0,8), 8 M Harnstoff und 1 × TBE gewählt. Die Detektion erfolgte über eine Silberfärbung der Nukleinsäuren (2.3.1.5).

2.3.3 Optische Denaturierungskurve

Die optischen Denaturierungskurven wurden über die Messung der Änderung der Hyperchromie von RNA mit einem Zwei-Wellenlängen-Spektralphotometer (*Sigma ZWS II*, BIOCHEM, München) in Durchfluß-Quarzküvetten mit 10 mm optischer Weglänge, 1 mm Durchmesser und 50 µl Fassungsvermögen aufgenommen [60, 148]. Die Regulierung der Heizrate des Thermostaten und die Erfassung der Absorptionswerte erfolgte mit der Software *DaisyLab*. In der Regel wurden 20–30 Wertetripel pro Grad bei einer Heizrate von 0,25 °C pro Minute aufgenommen. Die Auswertung erfolgte mit den intern

verfügbaren Programmen **Sigma** und **Meltfit**. Das Programm **Sigma** mittelt die Meßdaten über jeweils 1000 Werte und differenziert diese [148]. Aus den differenzierten Werten wurden mit dem Programm **Meltfit** die Enthalpien ΔH_{app} der Übergänge einer RNA gemäß erster Ordnung nach van't Hoff durch Optimierung von ΔA , ΔH^0 , ΔS^0 und T_M genähert.

Zur Vorbereitung der Messung wurden etwa 1 μg *in vitro* Transkript in 60 μl Schmelzkurvenpuffer aufgenommen und gegen den Puffer 2–3 Stunden auf Schwimmfiltern (MILLIPORE; 0,025 μm Porengröße) dialysiert. Die Probe wurde dann bei 70 °C 5 Minuten denaturiert und in –20 °C kaltem Ethanol schnell abgekühlt. Unmittelbar vor Beginn der Schmelzkurve wurde die Probe 5–10 Minuten mit Helium begast. 50 μl wurden in die Küvette gefüllt und die Einfüllstutzen mit Paraffinöl überschichtet.

Schmelzkurvenpuffer

	mit EDTA	mit Mg^{2+}
Nacacodylat	1 mM	1 mM
NaCl	10 mM	10 mM
EDTA	0.1 mM	-
MgCl_2		10 μM

2.3.4 Theoretische Sekundärstrukturvorhersage

Das Programm **LinAll** errechnet auf der Grundlage eines Energieminimierungsalgorithmus thermodynamisch optimale und suboptimale Sekundärstrukturen von RNA-Molekülen [138, 149]. Von den ausgegebenen Strukturen wird die Struktur mit dem geringsten ΔG -Wert als optimal bezeichnet. Die Sekundärstrukturen können in verschiedenen Darstellungen ausgegeben werden (Helix-Loop-Darstellung, Circle-Darstellung). Neben den optimalen und suboptimalen Strukturen ermittelt das Programm weiterhin, mit welcher Wahrscheinlichkeit ein Nukleotid basengepaart ist und die Zustandsverteilungsfunktion, in der die Anzahl der in die Berechnungen eingehenden Strukturen bei **einer** Temperatur angegeben wird. Wird die Zustandsverteilungsfunktion für mehrere Temperaturen berechnet, kann daraus die theoretische Vorhersage des optischen Schmelzverhaltens ausgegeben werden.

Das Programm macht die Berechnungen unter der Annahme einer Ionenstärke von 1 M NaCl. Um dies den in dieser Arbeit verwendeten Reaktionsbedingungen anzupassen, wurde für die Rechnungen ein Korrekturfaktor von 20 °C addiert. Für Experimente bei Raumtemperatur (ca. 25 °C) wurden dementsprechend Strukturen, die für 45 °C berechnet wurden, als theoretische Vergleichspunkte verwendet. Dieser empirische Korrekturfaktor wurde aus früheren Arbeiten an der *psbA* mRNA übernommen [79, 86] und basiert auf systematischen Denaturierungsstudien des *potato spindle tuber viroid* PSTVd [111, 126].

2.3.5 Spezifische Hydrolyse von RNA mit Pb²⁺-Ionen

2.3.5.1 Spezifische Hydrolyse von *in vitro* Transkripten mit Pb²⁺-Ionen

Das hier für die Hydrolyse von RNA mit Pb²⁺ verwendete Protokoll folgt weitgehend Matysiak *et al.* [99]. Für die Spaltung von *in vitro* Transkripten mit Pb²⁺ wurden 60–100 ng bzw. 20 000 cpm gelelutierte Transkript und 4 µg tRNA (als Tracer für die Spaltung) in 10 mM Tris/HCl, pH 7.2 und 40 mM NaCl 10 Minuten bei 65 °C denaturiert und anschließend langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Proben wurden dann auf die entsprechende Pb²⁺-Konzentration (0.5, 1 und 5 mM) durch Zugabe von frischem, in H₂O gelöstem Pb(OAc)₂ eingestellt und für 5 Minuten bei 25 °C inkubiert. Der Kontrolle wurde statt Pb(OAc)₂ ein entsprechendes Volumen H₂O hinzugefügt. Für Konkurrenzspaltungen in Gegenwart von Mg²⁺-Ionen wurden die Proben zunächst 15 Minuten bei 25 °C mit den entsprechenden Konzentrationen Mg(OAc)₂ (0, 25, 50, 100 und 200 mM) inkubiert und dann Pb(OAc)₂ zugegeben. Die Spaltungsreaktion wurde durch eine Natriumacetat/Ethanol Fällung (2.1.3.1) gestoppt. Unmarkierte Transkripte wurden in 6 µl H₂O resuspendiert und mit Primer Extension analysiert (2.4.2). Radioaktiv markierte Transkripte wurden direkt in Formamid-AP aufgenommen, denaturiert und in einem Sequenziergel aufgetrennt (2.3.1.2).

2.3.5.2 Spezifische Hydrolyse von RNA mit Pb²⁺-Ionen in organello

In Anlehnung an die von Lindell *et al.* beschriebene Pb²⁺-Spaltung *in vivo* in *E. coli* [92] wurde die Pb²⁺-Spaltung *in organello* etabliert. Dazu wurden – wie in 2.2.1.2 beschrieben – intakte Chloroplasten aus Spinat isoliert und die Proteinkonzentration nach Bradford bestimmt (2.2.1.3). Die Chloroplasten wurden in der Zeit zwischen Isolierung und Start der Pb²⁺-Spaltung auf Eis gehalten. Die Reaktion wurde in GR-Puffer durchgeführt, indem die intakten Chloroplasten nach der Isolierung vorlagen. Die Chloroplasten wurden dann mit frischem, in GR-Puffer gelöstem Pb(OAc)₂ auf 10, 50, 100 und 175 bzw. 250 mM Pb(OAc)₂ eingestellt, wobei die Proteinkonzentration im Reaktionsvolumen bei 5 mg/ml lag. Die Spaltung erfolgte dann für 0, 10, 15 und 20 Minuten (wahlweise auch 0, 10, 30 und 60 Minuten) bei Raumtemperatur. Nach der jeweiligen Zeitspanne wurde je ein Aliquot aus den Ansätzen der verschiedenen Pb²⁺-Konzentrationen entnommen, die Reaktion durch Zugabe 1 Volumen 0,5 M EDTA, 1/3 Volumen Stopplösung und 0,1 Volumen 10 % SDS gestoppt und die RNA durch Phenol/Chloroform Extraktion aufgereinigt (2.1.4). Anschließend wurde die isolierte RNA Natriumacetat/Ethanol gefällt (2.1.3.1), in 50 µl 1× TE resuspendiert und 1 Stunde auf Schwimmfiltern (MILLIPORE; 0,025 µm Porengröße) gegen 1× TE dialysiert. Die Pb²⁺-Spaltstellen auf der RNA wurden mit Primer Extension analysiert (2.4.2).

Stopplösung

Harnstoff	4 M
Tris/HCl, pH 8.0	50 mM
SDS	2 % (w/v)

2.3.6 Chemische Strukturanalyse durch Modifikation mit Diethylpyrocarbonat (DEPC)

Die DEPC-Behandlung und die anschließende Anilin-Spaltung wurde wie von Wyatt *et al.* [171] beschrieben durchgeführt. DEPC carboxyliert einzelsträngig vorliegende Adeninreste einer RNA an der N7-Position. Anilin spaltet das Phosphatrückgrat bei so modifizierten Basen. Da nur einzelsträngig vorliegende Adenosinnukleotide modifiziert werden, erlaubt diese Reaktion eine Aussage über die Struktur der verwendeten RNA.

Hier wurden 5'-endmarkierte *in vitro* Transkripte von (-86/+822) und des Minimalkonstrukts mit DEPC für 105 Minuten bei Raumtemperatur behandelt. Das DEPC wurde von FLUKA bezogen. 5'-endmarkierte Transkripte (2.2.2.3) mit einer Aktivität von 2×10^5 cpm wurden mit 3 μ g Tracer-RNA (Gesamt-RNA aus Spinat oder tRNA) in 100 μ l 50 mM Natriumcacodylat pH 7.0 gelöst. Die Proben wurden 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden je 20 μ l DEPC zugegeben, die Proben weiterhin bei Raumtemperatur inkubiert und alle 15 Minuten durch Vortexen neu durchmischt. Nach Ablauf der Reaktionszeit wurde die Reaktion durch Zugabe von 6 μ g Tracer-RNA gestoppt und mit 25 μ l 3 M Natriumacetat (NaOAc) und 500 μ l Ethanol (96 %; pharm. rein) für 1 Stunde bei -20°C gefällt und die RNA in der Tischzentrifuge (HETTICH EBA R12) bei 12000 rpm (1 Stunde) pelletiert. Die Pellets wurden anschließend in 100 μ l 0,3 M NaOAc aufgenommen und mit 300 μ l Ethanol ein weiteres Mal gefällt. Das Pellet wurde 1 Stunde luftgetrocknet, dann in 20 μ l Anilin/Essigsäure (1:1, v/v) gelöst und 10 Minuten bei 60°C inkubiert. Das Anilin wurde von SIGMA bezogen. Um die Proben von DEPC und Anilin zu reinigen, wurden nach der Inkubation 20 μ l H_2O zum Reaktionsansatz dazugegeben und die Probe in der Speed Vac getrocknet. Das Lyophilisat wurde noch zwei weitere Male in Wasser aufgenommen und getrocknet. Die Pellets wurden in einem geeigneten Volumen Formamid-AP aufgenommen, 3 Minuten bei 95°C denaturiert und in einem Sequenziergel aufgetrennt (2.3.1.2).

2.4 Biochemisch-enzymatische Methoden

2.4.1 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung wurde als Standard zur Auswertung der Primer Extension Analysen (2.4.2) benötigt. Es wurden nach der Kettenabbruchmethode von Sanger *et al.* [136] die in 2.1.2 angegebenen Plasmide (je nach verwendetem Primer ausgewählt; siehe Anhang A.1) sequenziert. Bei der Kettenabbruchmethode wird ein Primer, der an ein Template hybridisiert ist, von einer DNA-abhängigen DNA-Polymerase verlängert. Die Verlängerung findet in Gegenwart der vier verschiedenen Didesoxynukleotide (ddNTPs) statt, was in den unterschiedlichen Ansätzen zu einem statistischen Abbruch der DNA-Synthese an Positionen des jeweils zugesetzten ddNTP führt, da den ddNTPs die zur 5'-3'-Verknüpfung notwendige 3'-OH-Gruppe fehlt und die Kette nach Einbau eines

ddNTPs zwangsläufig endet. Zur Sequenzierung wurde der *Sequenase Version 2.0 DNA Sequencing Kit* von USB nach Vorschrift verwendet.

Alkalische Denaturierung Zunächst mußten die Plasmide denaturiert werden. Der Reaktionsansatz wurde 30 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend durch Zugabe von 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat, pH 4.5 und 3 Volumen Ethanol (96 %; pharm. rein) für 45 Minuten auf Eis gefällt. Die durch Zentrifugation pelletierte DNA wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 7 µl H₂O resuspendiert.

Alkalische Denaturierung

Plasmid	5 µg
4 M NaOH	2 µl
20 mM EDTA	2 µl
H ₂ O	ad 20 µl

Hybridisierung An das denaturierte Plasmid wurde im nächsten Schritt der Primer hybridisiert. Der Hybridisierungsansatz wurde dafür auf 90°C erhitzt und langsam auf 30°C abgekühlt.

Hybridisierungsansatz

denaturiertes Plasmid in H ₂ O	7 µl
Sequenase 2.0 Reaktionspuffer (10×; USB)	2 µl
Primer	1 pmol
<hr/>	
Endvolumen	10 µl

Verlängerungsreaktion Die Verlängerung des Primers und Neusynthese eines komplementären Stranges erfolgte nun durch die DNA-abhängige DNA-Polymerase Sequenase 2.0. Der Verlängerungsansatz wurde für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Verlängerung fand in Gegenwart von α-³²P-dATP statt, so daß eine spätere Detektion der Nukleinsäure durch Autoradiographie ermöglicht wurde.

Verlängerungsansatz

Hybridisierungsansatz	10 µl
DTT (0,1 M; USB)	1 µl
α- ³² P-dATP (spez. Akt. 3000 Ci/mmol; 10 µCi/µl)	1 µl
Labeling-Mix (dGTP; 1:4 verdünnt in H ₂ O, USB)	2 µl
Sequenase 2.0 (1:8 verdünnt in Verdünnungspuffer (USB))	2 µl

Termination Die Termination wurde durch Zugabe von ddNTPs zu der Verlängerungsreaktion gestartet. Hierzu wurden vier Reaktionsgefäße mit jeweils 2,5 µl eines ddNTP vorgelegt und auf 37°C erwärmt. Nach Ablauf der 5 Minuten Verlängerung, wurden jeweils 3,5 µl des Verlängerungsansatzes zu jedem der vier ddNTP-Ansätze gegeben und weitere 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 20 µl

Formamid-AP und einer Denaturierung für 3 Minuten bei 95 °C gestoppt. Die Nukleinsäure wurde in einem Sequenziergel (2.3.1.2) aufgetrennt und durch Autoradiographie detektiert (2.3.1.4).

2.4.2 Primer Extension Analyse

Die Primer Extension Analyse wurde angewendet, um Spaltstellen von zweiwertigen Ionen auf einem RNA-Molekül zu bestimmen. Nach der Spaltreaktion wird an die RNA ein DNA-Oligonukleotid hybridisiert und von ihm ausgehend durch eine RNA-abhängige DNA-Polymerase ein zur RNA komplementärer DNA-Strang synthetisiert, der am 5'-Ende der RNA – bei Spaltreaktionen der nächstliegenden Spaltstelle – abbricht.

Zur Detektion der neusynthetisierten DNA-Stränge wurden die verwendeten Oligonukleotide radioaktiv 5'-endmarkiert (siehe Anhang A.1). Um die Länge bzw. die Position der Spaltstellen ermitteln zu können, wurde als Standard eine Sequenzierung einer entsprechenden DNA-Sequenz (2.4.1; Plasmide siehe 2.1.2 und Anhang A.2) mit dem gleichen Oligonukleotid benutzt.

Zunächst wurde an die gespaltene RNA ein radioaktiv markiertes Oligonukleotid hybridisiert (2.2.2.4). Die Menge der eingesetzten RNA hing vom vorangehenden Experiment ab. Von gespaltenen *in vitro* Transkripten wurden etwa 60–100 ng (enthält außerdem 4 µg tRNA: siehe 2.3.5.1) eingesetzt, von Gesamt-RNA aus Chloroplasten 4–5 µg.

Hybridisierungsansatz

gespaltene RNA + H ₂ O	3 µl
5× Hybridisierungspuffer	1 µl
Oligonukleotid (ca. 5 × 10 ⁵ cpm)	1 µl

5× Hybridisierungspuffer

HEPES, pH 7.0	250 mM
KCl	500 mM

Der Hybridisierungsansatz wurde 2 Minuten bei 80 °C erhitzt und dann langsam auf 35 °C abgekühlt (etwa 4 h). Anschließend wurden 7,5 µl des Verlängerungsmix dazugegeben und 45 Minuten bei 55 °C inkubiert. 55 °C entspricht dem Temperaturoptimum der verwendeten Polymerase Superscript II.

Verlängerungsmix

dNTPs (10 mM)	0,625 µl
DTT (0,1 M)	1,25 µl
5× Reaktionspuffer	2,5 µl
Superscript II (200 U/ µl)	0,625 µl
H ₂ O	2,5 µl

Das DTT, der Reaktionspuffer und die Superscript II wurden von GIBCO BRL und INVITROGEN bezogen und nach Herstellerangaben eingesetzt. Die Verlängerungsreaktion wurde durch Zugabe von 12,5 µl Formamid-AP und Denaturieren für 3 Minuten bei 95 °C gestoppt. Die Proben wurden in einem Sequenziergel (2.3.1.2) aufgetrennt und durch Autoradiographie (2.3.1.4) detektiert.

3 Ergebnisse

Die Akkumulation der chloroplastenkodierten *psbA* mRNA wird während der Blattentwicklung posttranskriptional über die Stabilität der mRNA reguliert. In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, daß für die Stabilisierung dieser mRNA im Laufe der Chloroplastenentwicklung die Änderung der Konzentration an Mg^{2+} -Ionen hinreichend ist [67]. Es gibt keine Hinweise darauf, daß Proteine direkt an der Vermittlung der Stabilisierung der mRNA beteiligt sind.

Auf diesen Ergebnissen aufbauend war es das Ziel dieser Arbeit, die Strukturelemente der chloroplastenkodierten *psbA* mRNA zu identifizieren, die mit zweiwertigen Kationen – insbesondere Mg^{2+} -Ionen – wechselwirken und damit *cis*-regulatorisch an der Stabilisierung der mRNA beteiligt sein könnten. Im ersten Teil dieser Arbeit wurden kurze Bereiche der *psbA* mRNA, die bekannte funktionale Elemente enthalten, ausgewählt und ihre Sekundärstruktur und Thermodynamik experimentell und *in silico* analysiert.

Im zweiten Teil wurde untersucht, ob *long range* Strukturelemente zwischen 5'- und 3'-Ende der *psbA* mRNA nachweisbar sind. Das Vorkommen solcher *long range* Strukturelemente wird bereits von früheren, experimentellen Daten postuliert [143]. Um die minimalen Sequenzanforderungen und die Mg^{2+} -Abhängigkeit für ein *long range* Strukturelement zu analysieren, wurde die spezifische Hydrolyse mit Pb^{2+} -Ionen auf 3'-seitig verkürzte *in vitro* Transkripte der *psbA* mRNA und die endogene mRNA *in organello* angewandt. Auf der Grundlage der so erhaltenen Daten wurde ein Minimalkonstrukt des *long range* Strukturelements entworfen und experimentell charakterisiert.

3.1 Auswahl von RNA-Bereichen

Frühere Studien haben gezeigt, daß Mg^{2+} -Ionen eine zentrale Rolle bei der Stabilisierung der *psbA* mRNA im Laufe der Chloroplastenentwicklung spielen [67]. Daher stellt sich die Frage, welche Sequenzbereiche und Strukturelemente an der Wechselwirkung der *psbA* mRNA mit Mg^{2+} -Ionen beteiligt sind. Zur Analyse der RNA- Mg^{2+} -Wechselwirkung wurden in dieser Arbeit thermodynamische Methoden wie TGGE und optische Schmelzkurven herangezogen. Diese Methoden liefern allerdings nur bei RNAs mit einer Länge bis etwa 300 nt interpretierbare Daten, so daß es notwendig war, zunächst kürzere Sequenzbereiche der *psbA* mRNA, die insgesamt 1247 nt lang ist, auszuwählen. Als Kriterien für die Auswahl galten:

- Lokale bzw. konservierte Strukturelemente sollten erhalten bleiben.
- Die Fragmente sollten bereits bekannte Motive/Funktionen enthalten.

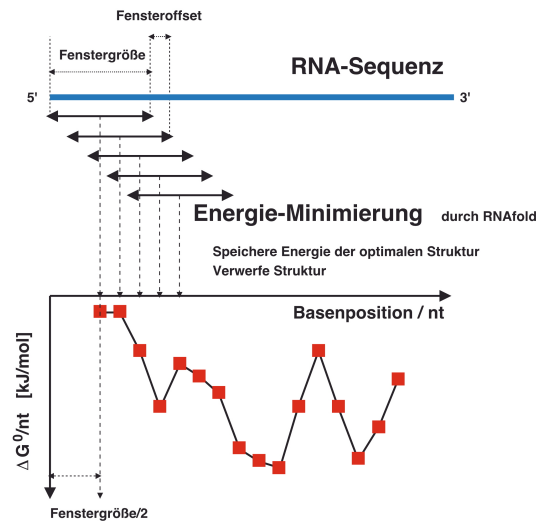


Abbildung 3.1: **Schema der Bearbeitung durch SearchStruct.** Das Schema wurde freundlicherweise von Herrn apl.Prof. Dr. G. Steger zur Verfügung gestellt.

3.1.1 Energielandschaft der *psbA* mRNA

Für die *psbA* mRNA lagen bereits Daten zur Konsensusstruktur und der thermodynamisch optimalen Struktur auf der Grundlage der Energieminimierung vor [66]. Die lokalen bzw. konservierten Strukturelemente der *psbA* mRNA, die aus diesen Daten ermittelt wurden, sollten bei der Auswahl der kürzeren Fragmente erhalten bleiben, daher wurde die theoretische Analyse mit dem Werkzeug **SearchStruct** ergänzt.

Bei der Vorhersage von RNA-Strukturen mit Algorithmen zur Energieminimierung wird als optimale Struktur, die mit der geringsten freien Energie ΔG_T^0 ausgegeben. Mit zunehmender Länge der RNA wird die Vorhersage dieser Struktur immer unzuverlässiger, da kinetische Effekte eine größere Rolle bei der Faltung spielen und die Häufigkeit von Verzweigungsloops zunimmt, für die keine zuverlässigen thermodynamischen Parameter bekannt sind. Bei Sequenzen >1000 nt liegt die Zuverlässigkeit der Strukturvorhersage nur noch bei ca. 70%. Mit **SearchStruct** ist es möglich, in langen RNAs gezielt die Regionen zu finden, die lokal besonders stabile Strukturen ausbilden. Dazu wird ein Sequenzfenster der Fenstergröße *window size* nt in Schritten (Fensteroffset) von *offset* nt über die Sequenz geschoben. Für jede Subsequenz wird die minimale Energie ΔG_T^0 ermittelt und gegen die Position in der Gesamtsequenz bei halber Fenstergröße aufgetragen. Dies ist schematisch in Abb. 3.1 dargestellt. Aus Wiederholungen mit zunehmender Größe des Sequenzfensters resultiert eine Energielandschaft, in der die Fenstergröße gegen die Sequenz aufgetragen wird und die Darstellung der Energiewerte farbkodiert in der dritten Dimension erfolgt. Dabei werden in blau Bereiche mit hoher Energie (instabilere Strukturen) wiedergegeben und in rot Bereiche mit niedriger Energie (stabilerere Strukturen). Aus der Energielandschaft einer RNA läßt sich dann anhand der

Lage eines besonders stabilen Bereichs (rot) ablesen, welches Sequenzfenster (Position auf der Gesamtsequenz und Fenstergröße) für die Ausbildung dieses Strukturelements notwendig ist. Abb. 3.2 zeigt die Energielandschaft der *psbA* mRNA.

Aus der Energielandschaft geht hervor, daß es in der *psbA* mRNA keine stabile Struktur gibt, für die ein Sequenzfenster >300 nt notwendig ist. Zum Teil werden die Energien der Strukturen der Subsequenzen bei zunehmender Fenstergröße auch wieder größer. Die Mehrheit der Subsequenzen mit einer energetisch günstigen Sekundärstruktur liegt bei einer Größe des Sequenzfensters von ca. 200 nt. Entsprechend wurde eine Sequenzlänge von 200 nt als geeignete Größe für Fragmente der weiteren thermodynamischen Analyse zugrunde gelegt. Die Energielandschaft gibt keinen Hinweis auf eine *long range* Wechselwirkung zwischen 5'- und 3'-Ende der mRNA, die von der thermodynamisch optimalen Struktur (siehe Abb. 3.21), aber nicht der Konsensusstruktur vorhergesagt wird [66]. Der Bereich mit besonders geringer Energie am 3'-Ende umfaßt die Sequenz des 3'-IR, das eine stabile Haarnadelstruktur ausbilden kann.

3.1.2 Ausgewähltes Fragment der *psbA* mRNA

Aufgrund der theoretischen Analyse und den bisher bekannten Daten wurde als Fragment der Sequenzbereich (-86 bis +131)¹ ausgewählt. Das Fragment ist 220 nt lang und enthält die vollständige 5'-UTR sowie einen Teil der kodierenden Sequenz. Weiterhin liegen in diesem Sequenzbereich funktional bedeutsame Elemente wie:

- das Startcodon
- die potentielle Ribosomenbindestelle (Pos. -40 bis -37; Sequenz GGAG)
- die erste Schnittstelle im mRNA-Abbau vom 5'-Ende her (Pos. -48; [75])
- eine Mg²⁺-abhängige Pb²⁺-Spaltstelle (Pos. -5; [143])
- zwei potentielle RNase E Schnittstellen (favorisiertes, potentielles Enzym für die Einleitung des mRNA-Abbaus in *E. coli*; [102])

Das Fragment enthält damit Struktur- und Sequenzelemente, die für die RNA Stabilität und die Translation bzw. deren Kontrolle von besonderer Bedeutung sind.

Zusätzlich wurde ein Fragment ausgewählt, das 200 nt lang ist, den Sequenzbereich [+962 bis +1161] umfaßt und damit die 3'-IR am 3'-Ende der *psbA* mRNA enthält. Dieses Fragment sollte – insbesondere bei der TGGE-Analyse – als Kontrolle für den Effekt unterschiedlicher Kationen auf die Struktur der RNA-Fragmente dienen, da die

¹Im folgenden sind Sequenzpositionen, die sich auf das Startcodon beziehen in positiven (stromabwärts vom Startcodon) und negativen (5'-untranslatierte Region) Zahlen nach Zurawski *et al.* [176] angegeben; alle Sequenzangaben ohne Vorzeichen beziehen sich auf die Nukleotidnummer im jeweiligen Transkript beginnend bei 1 unabhängig vom Startcodon!

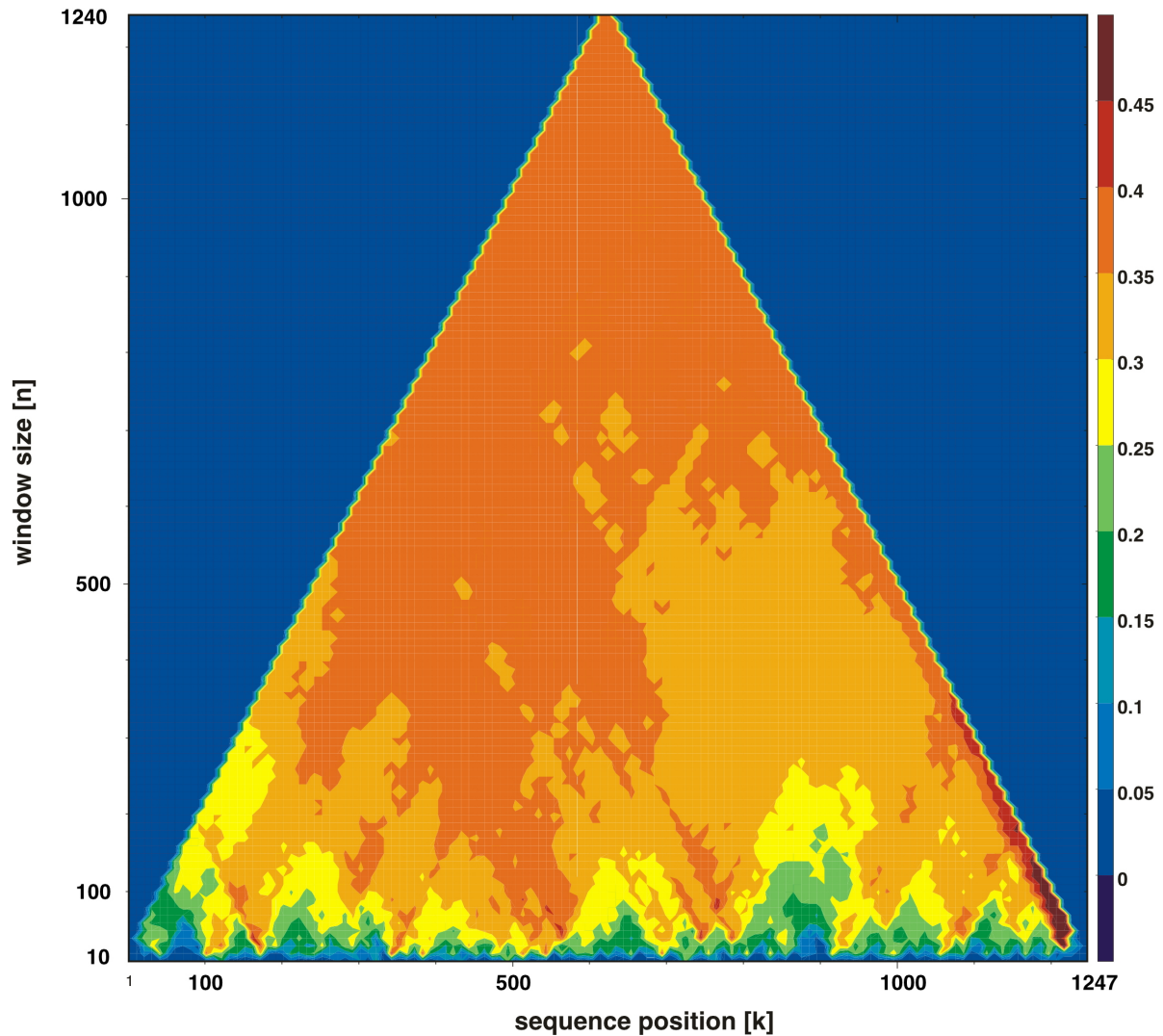


Abbildung 3.2: **Energielandschaft der psbA mRNA.** Die Berechnung wird für Subsequenzen der Größe 10 nt bis 1247 nt (*window size*) durchgeführt. Die Subsequenzen werden in Schritten von *Fenster-Offset*=10 nt über die Sequenz geschoben. Die Energie ΔG_T^0 der optimalen Substruktur wird gegen die Position der Subsequenz in der Gesamtsequenz farbkodiert aufgetragen. Bei dieser Darstellung repräsentieren rot gefärbte Bereiche Subsequenzen mit stabiler Sekundärstruktur.

vom 3'-IR ausgebildete Haarnadelstruktur mit hoher Wahrscheinlichkeit vorhergesagt werden kann. Helices als Sekundärstrukturelemente reagieren nur mit einer allgemeinen Stabilisierung auf eine Erhöhung der Ionenstärke durch zweiwertige Kationen und nicht mit einer Änderung der Struktur. Das Denaturierungsverhalten dieses Fragments läßt sich daher mit großer Sicherheit vorhersagen und sollte lediglich eine Stabilisierung in Anwesenheit von Kationen zeigen.

3.2 Strukturanalyse des 5'-Endes der *psbA* mRNA

3.2.1 TGGE-Analyse des 5'-Endes der *psbA* mRNA

Die TGGE-Analyse ermöglicht die Untersuchung der Konformationen bzw. der Strukturverteilung von RNAs im thermodynamischen Gleichgewicht anhand ihres Denaturierungsverhalten. Als Meßgröße dient hier die Mobilitätsänderung eines RNA-Moleküls entsprechend seinem Denaturierungsgrad. Die Mobilitätsänderung ist – im Gegensatz zur Hypochromie, die bei den optischen Denaturierungskurven gemessen wird – eine indirekte Meßgröße, da nicht jede Öffnung eines Basenpaares oder Umlagerung der Struktur einen sichtbaren Effekt auf die Gelmobilität des Moleküls hat. Andererseits erlaubt die TGGE die Diskriminierung beliebig vieler nebeneinander vorliegender Konformationen eines RNA-Moleküls, wenn sie unterschiedliche Mobilität im PAA-Gel zeigen.

Hier sollte mit der TGGE-Analyse das 5'-Ende der *psbA* mRNA (-86/+131) thermodynamisch unter verschiedenen Salzbedingungen untersucht werden. Insbesondere der Effekt von Mg^{2+} -Ionen war Ziel der Analyse. Als Vergleich wurde ein ähnlich langes Transkript des 3'-Endes der *psbA* mRNA (+962/+1161) verwendet, das den Sequenzbereich enthält, der eine stabile Haarnadelstruktur ausbilden kann. Die *in vitro* Transkripte (-86/+131) und (+962/+1161) wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an Mg^{2+} -Ionen vor einem Hintergrund von 20 mM Na^+ -Ionen mit TGGE analysiert, wobei ein Temperaturbereich von 5-90°C betrachtet wurde.

TGGE-Analyse des Transkripts (-86/+131) Abbildung 3.3 zeigt die TGGE-Analyse des Transkripts (-86/+131). Nebeneinander sind jeweils die TGGEs einer $MgSO_4$ -Konzentration für die verschiedenen Temperaturbereiche abgebildet, untereinander jeweils die TGGEs eines Temperaturbereichs mit verschiedenen $MgSO_4$ -Konzentrationen. In der oberen Reihe sind die TGGEs mit 10 mM Na_2SO_4 (entspricht 20 mM Na^+ -Ionen) ohne Zusatz von $MgSO_4$ abgebildet. Im kalten Temperaturbereich (5–35°C) sieht man bei ca. 25°C einen Übergang, an dem eine Nebenbande (N), die leicht oberhalb der Hauptbande (H) läuft, in die Hauptbande übergeht. Im mittleren Temperaturbereich (20–60°C) erkennt man einen weiteren Übergang bei etwa 40°C. Dieser Übergang sollte zumindest teilweise auch in der TGGE des kalten Temperaturbereichs zu sehen sein. Da der Übergang allerdings bei 5–35°C am Rand des Temperaturgradienten liegt, kann man ihn hier nicht eindeutig erkennen. Im heißen Temperaturbereich (50–90°C; 20–60°C

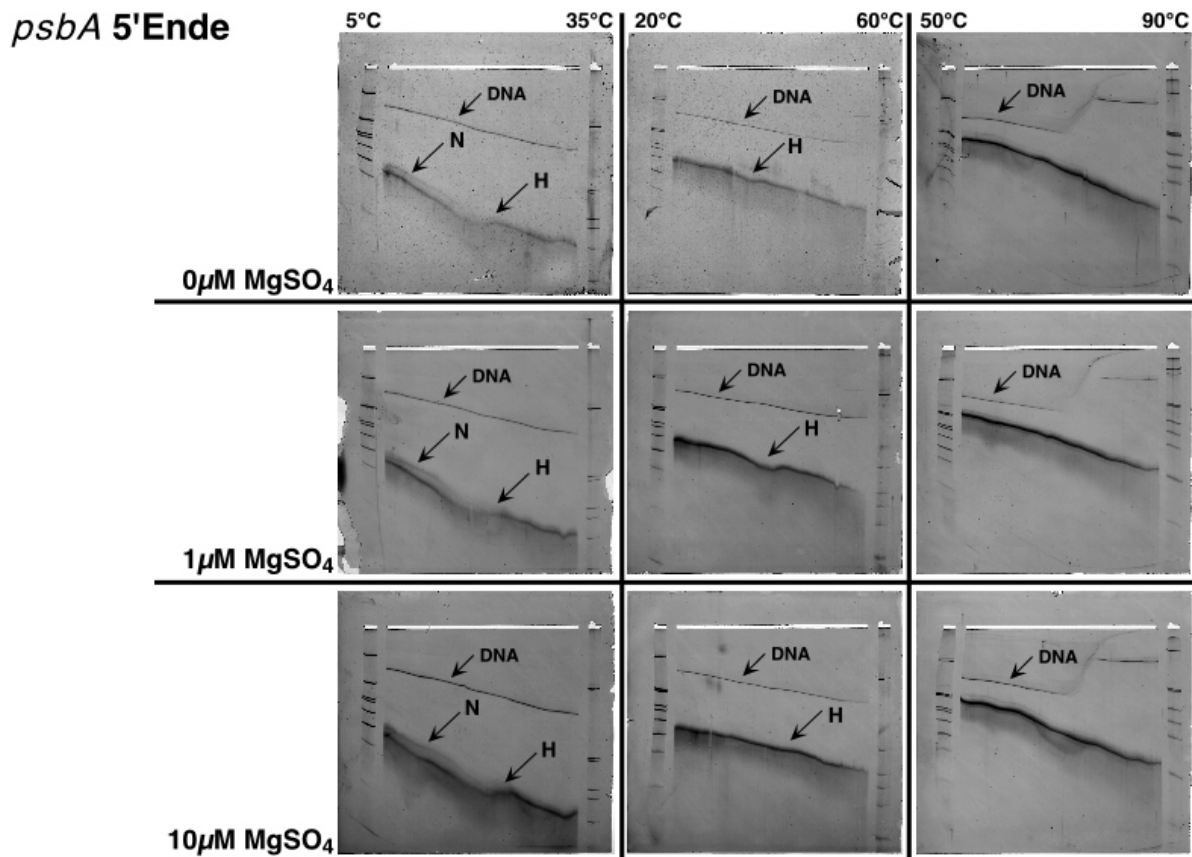


Abbildung 3.3: **TGGEs des *in vitro* Transkripts (-86/+131).** Das *in vitro* Transkript (-86/+131) wurde in TGGEs mit 5% PAA (Vernetzungsgrad 30:0,8), 0,2×TB, 10 mM Na₂SO₄ und 0, 1 oder 10 μM MgSO₄ analysiert. Es wurden drei überlappende Temperaturbereiche gewählt: 5–35°C, 20–60°C und 20–60°C mit 8 M Urea (entspricht: ca. 50–90°C). Der Nachweis erfolgte über Silberfärbung.

mit 8 M Urea) zeigen sich keine weiteren Übergänge, so daß das Transkript (-86/+131) ab 50°C unter diesen Bedingungen weitgehend denaturiert zu sein scheint bzw. ohne sichtbare Mobilitätsunterschiede denaturiert.

In der mittleren Reihe von Abb. 3.3 ist die TGGE-Analyse von (-86/+131) mit 10 mM Na₂SO₄ und 1 μM MgSO₄ gezeigt. Im kalten Temperaturbereich zeigt sich hier keinerlei Veränderung gegenüber dem Laufverhalten ohne Mg²⁺-Ionen, während im mittleren Temperaturbereich der Übergang bei 40°C zu höheren Temperaturen auf ca. 45°C verschoben ist. Bei genauem Vergleich der TGGEs des kalten Temperaturbereichs kann man auch dort diese Verschiebung erkennen. Während die TGGE, die nur Na⁺-Ionen enthält (obere Reihe) um 35°C eine kleine Verzögerung der RNA zeigt, die den Beginn des Übergangs bei 40°C darstellt, ist diese bei der TGGE mit 1 μM MgSO₄ nicht zu erkennen. Im heißen Temperaturbereich zeigen sich – wie auch schon ohne zugesetzte

Mg²⁺-Ionen – keinerlei Unterschiede im Laufverhalten, sondern lediglich eine allgemeinen Beschleunigung wie sie für alle Nukleinsäuren in PAA-Gelen bei steigender Temperatur zu beobachten ist. Diese Beschleunigung wird auf die Änderung der Fluidität der Gelmatrix in Abhängigkeit von der Temperatur zurückgeführt.

In der unteren Reihe in Abb. 3.3 ist die TGGE-Analyse mit 10 µM MgSO₄ abgebildet. Hier ist der Übergang bei 25 °C zwar ausgeprägter als ohne bzw. mit 1 µM MgSO₄, aber er ist nicht zu höheren Temperaturen hin verschoben, was man eigentlich bei einer Erhöhung der Ionenstärke – insbesondere durch ein zweiwertiges Kation wie Mg²⁺ – erwarten würde. Der Übergang im mittleren Temperaturbereich ist deutlich weniger ausgeprägt als in den anderen TGGEs. Außerdem ist er in den Randbereich der TGGE auf ca. 55 °C gerückt, wo die Identifikation von Übergängen generell schwierig ist und hier zusätzlich durch die beginnende Degradation der RNA durch Mg²⁺-Ionen ab 50 °C erschwert wird. Allerdings erkennt man bei 10 µM MgSO₄ im heißen Temperaturbereich zwischen 50 und 60 °C eine leichte Welle in der Hauptbande der RNA, die vermutlich von dem Übergang bei 55 °C herrührt. Damit zeigen die beiden in der TGGE zu beobachtenden Übergänge des Transkripts (-86/+131) eine völlig unterschiedliche Reaktion auf Mg²⁺-Ionen. Während der Übergang bei 25 °C stärker ausgeprägt, aber thermisch nicht stabilisiert wird, verhält sich der Übergang bei 40 °C entgegengesetzt: er ist mit steigender MgSO₄-Konzentration weniger ausgeprägt, wird aber deutlich stabiler.

TGGE-Analyse des Transkripts (+962/+1161) Anders verhält sich das Transkript (+962/+1161), das die Sequenz des 3'-Endes der *psbA* mRNA enthält und eine stabile Haarnadelstruktur ausbilden kann. In Abb. 3.4 ist die TGGE-Analyse dieses Transkripts gezeigt. Die obere Reihe zeigt wieder die TGGEs mit 10 mM Na₂SO₄ ohne MgSO₄. Im kalten Temperaturbereich wird das Transkript stark beschleunigt. Die Transkriptbande zeigt mehrere Übergänge (1–4), die aber zu schwach ausgeprägt sind, um konkreten Temperaturen zugeordnet werden zu können. Im mittleren Temperaturbereich ist der Lauf zu höheren Temperaturen hin deutlich weniger beschleunigt. Ab 30 °C scheint ein neuer Übergang zu beginnen, der am Rand des kalten Temperaturbereichs nicht eindeutig erkennbar, aber im mittleren Temperaturbereich als deutlich ausgeprägter Übergang bei etwa 35 °C zu sehen ist (5). Ab etwa 50 °C zeigt sich im mittleren Temperaturbereich eine starke Degradation der RNA, die dazu führt, daß die Transkriptbande nahezu vollständig verschwindet. Im heißen Temperaturbereich ist die Transkriptbande bis etwa 60 °C (→30 °C mit 8 M Urea) etwas diffus (6), was auf mehrere Konformationen oder eine nicht eindeutig definierte Struktur hindeutet. Als Vergleich hätte hier der entsprechende Bereich der mittleren TGGE dienen können, der aber wegen der starken Degradation keine Aussage liefert.

Mit 1 µM MgSO₄ zeigen sich die schwach ausgeprägten Übergänge des kalten Temperaturbereichs etwas deutlicher und sind zu höheren Temperaturen hin verschoben (1–3). Im mittleren Temperaturbereich sieht man statt des bisher einen Übergangs bei 35 °C mehrere schwächer ausgeprägte Übergänge (3–5). Der Übergang bei 35 °C ist mit 1 µM

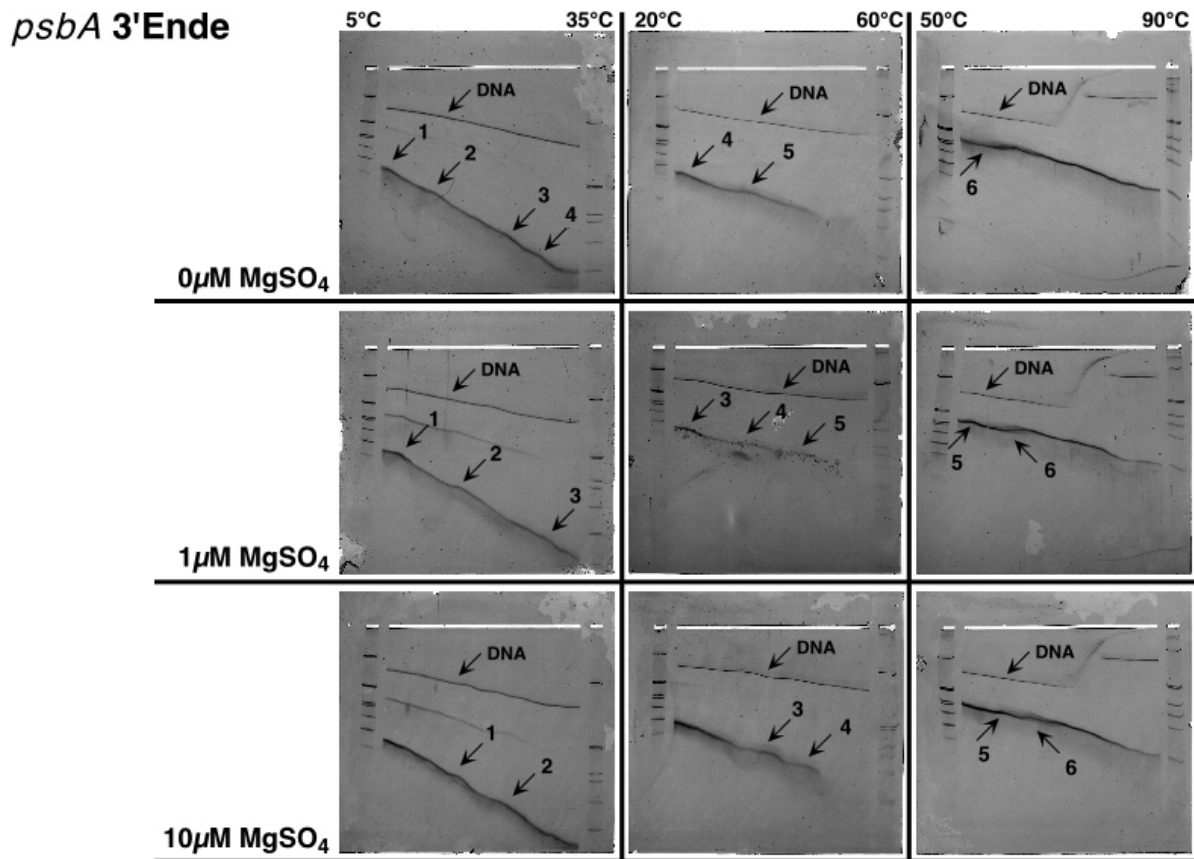


Abbildung 3.4: **TGGEs des *in vitro* Transkripts (+962/+1161).** Das *in vitro* Transkript (+962/+1161) wurde in TGGEs mit 5% PAA (Vernetzungsgrad 30:0,8), 0,2×TB, 10 mM Na₂SO₄ und 0, 1 oder 10 μM MgSO₄ analysiert. Es wurden drei überlappende Temperaturbereiche gewählt: 5–35°C, 20–60°C und 20–60°C mit 8 M Urea (entspricht: ca. 50–90°C). Der Nachweis erfolgte über Silberfärbung.

MgSO₄ ebenfalls zu höheren Temperaturen hin verschoben (5). Denselben Effekt hat MgSO₄ im heißen Temperaturbereich. Hier ist die Transkriptbande bei 50°C zunächst noch scharf und der diffuse Bereich ist zu etwa 60°C verschoben (6).

Auch mit 10 μM MgSO₄ (untere Reihe) setzt sich der Effekt einer allgemeinen Stabilisierung des Transkripts fort. Alle Übergänge sind – ohne Effekt auf ihre Form – zu höheren Temperaturen verschoben. Damit zeigt dieses Transkript – wie erwartet – lediglich eine allgemeine Stabilisierung und im Vergleich zum Transkript (-86/+131) keinerlei spezifischen Effekt einzelner Übergänge auf die Anwesenheit von Mg²⁺-Ionen.

3.2.2 Optische Denaturierungskurve des 5'-Endes der psbA mRNA

Bei optischen Denaturierungskurven wird die Hypochromie einer Nukleinsäure im Laufe ihrer thermischen Denaturierung aufgezeichnet. Als Hypochromie wird die Absorptionzunahme einer Nukleinsäure beim Übergang von einem Zustand höherer Ordnung zu einem geringerer Ordnung bezeichnet. Aufgrund ihrer Ähnlichkeit mit einem Phasenübergang wird die Auftragung der Hypochromie gegen die Temperatur auch als Schmelzkurve bezeichnet. Im Gegensatz zur Mobilitätsänderung ist die Hypochromie eine direkte Meßgröße, die sich unmittelbar aus der Anzahl der an einem Übergang beteiligten Basenpaare ableitet. Man kann aus der Hypochromie den T_M -Wert (Temperatur bei halbmaximaler Hypochromie) und die Halbwertsbreite $\Delta T_{1/2}$ eines Strukturübergangs bestimmen. Die Halbwertsbreite $\Delta T_{1/2}$ ist bei reversiblen Übergängen proportional der Enthalpie ΔH^0 und damit ein Maß für die Anzahl der im Übergang aufgehobenen Stapelwechselwirkungen zwischen Basen. Da A:U und G:C Basenpaare unterschiedliche Absorptionseigenschaften haben, kann aus der Differenz der Absorption bei 260 nm (Absorptionsmaximum A:U) und 280 nm (Absorptionsmaximum G:C) am T_M -Wert der G:C-Gehalt des aufgeschmolzenen Strukturelements berechnet werden [47].

Es wurden dialysierte Proben verwendet, die durch „slow cooling“ vorbehandelt wurden. Beim „slow cooling“ werden durch das langsame Abkühlen nach der Denaturierung thermodynamisch optimale Strukturen begünstigt. In Abb. 3.5 ist die optische Schmelzkurve des Transkripts (-86/+131) dargestellt.

Es sind sowohl De- als auch Renaturierung abgebildet, wobei die Drift, die die höheren Absorptionswerte bei der Renaturierung hervorruft, ein gerätespezifischer Effekt ist. Die Schmelzkurve wurde in 10 mM NaCl, 1 mM Natriumcacodylat und 0.1 mM EDTA aufgenommen und hatte damit etwa die halbe Ionenstärke der TGGE-Analyse (10 mM $\text{Na}_2\text{SO}_4 \rightarrow 20 \text{ mM Na}^+$ -Ionen). Die differenzierte Kurve (Abb. 3.5 rechts) zeigt zwei Übergänge (Maxima): einen bei ca. 25°C und einen bei 59°C. Der Übergang bei 59°C ist steil und hat eine geringe Halbwertsbreite, was darauf schließen läßt, daß bei diesem Übergang viele Basenpaare geöffnet werden. Der Übergang bei 25°C ist in den Absorptionen, die bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen wurden (blaue Kurve), fast nicht zu erkennen, sondern nur in der Absorptionsmessung bei 260 nm (rote Kurve). Da A:U Basenpaare bei 260 nm ihr Absorptionsmaximum haben und G:C Basenpaare bei 280 nm, kann man daraus schließen, daß an diesem Übergang fast ausschließlich A:U-Basenpaare beteiligt sind. Aus der großen Halbwertsbreite dieses Übergangs läßt sich schließen, daß hier nur wenige Basenpaare geöffnet werden. Dieser Übergang korreliert mit dem Übergang bei 25°C in der TGGE-Analyse. Die Daten weisen darauf hin, daß bei 25°C und der betrachteten Ionenstärke ein aus wenigen A:U-Basenpaaren bestehendes Strukturelement denaturiert, das einen deutlichen Effekt auf die Gelmobilität des Moleküls hat.

Weniger eindeutig ist die Interpretation des Übergangs bei 59°C. Es handelt sich um ein stabiles Strukturelement, zu dessen Denaturierung relativ viele Basenpaare koopera-

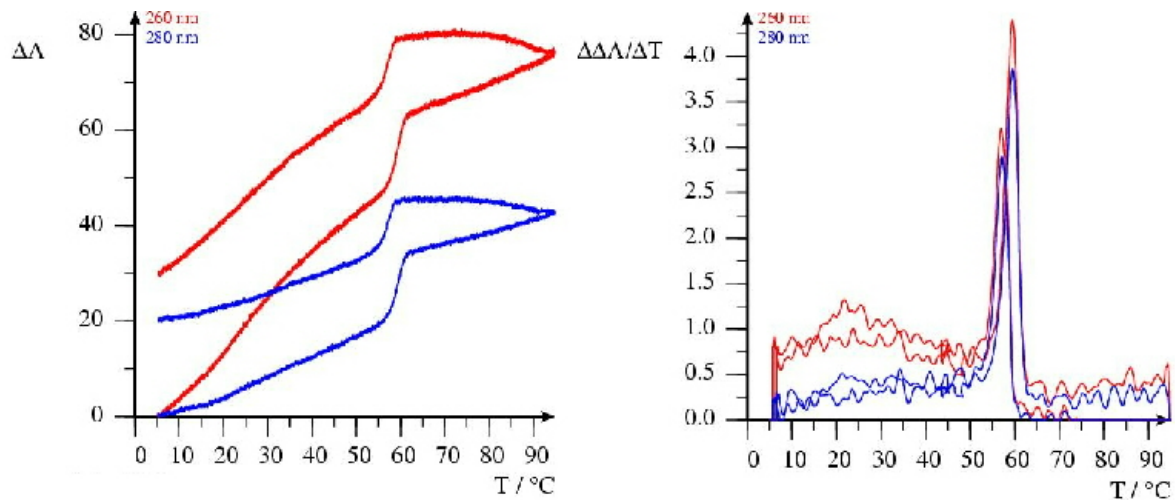


Abbildung 3.5: **Optische Schmelzkurve des Transkripts (-86/+131).** Die optische Schmelzkurve des Transkripts (-86/+131) in integrierter (links) und differenzierter (rechts) Form. Es ist sowohl die De- als auch die Renaturierung abgebildet, wobei die Renaturierung durch eine gerätespezifische Drift zu höheren Absorptionswerten verschoben ist. Bedingungen: 10 mM NaCl, 1 mM Nacacodylat, 0.1 mM EDTA. Temperaturbereich: 5–95°C. Heizrate: 1°C/Minute

tiv geöffnet werden. Allerdings ist in den TGGE-Analysen kein dazu korrespondierender Übergang zu finden. Es kann sich nicht um den Übergang bei 40°C in der TGGE handeln, da dieser trotz doppelter Ionenstärke einen 20°C niedrigeren T_M -Wert haben müßte. Stattdessen zeigt der Übergang bei 40°C in der TGGE-Analyse jedoch eine Stabilisierung mit zunehmender Ionenstärke (Abb. 3.3). Es ist unklar, warum der Übergang bei 59°C, in dem das Molekül fast vollständig denaturiert – die optische Schmelzkurve zeigt keinen weiteren Übergang – keinen Effekt auf die Gelmobilität hat. Wenn ein großer basengepaarter Bereich bei einer definierten Temperatur denaturiert, wäre eigentlich eine Wirkung auf die Mobilität des Moleküls im Gel – Beschleunigung oder Verzögerung – zu erwarten.

In Abb. 3.6 ist die mit dem Programm **Linall** vorhergesagte theoretische Schmelzkurve des Transkripts (-86/+131) gezeigt. Die theoretische Vorhersage wird für eine Ionenstärke von 1 M NaCl berechnet, so daß die Temperaturen zur Vergleichbarkeit durch einen Faktor an die experimentellen Bedingungen angepaßt werden müssen [58, 149].

Die theoretische Schmelzkurve sagt zwei Übergänge vorher: bei 48°C und bei 65°C. Der Übergang bei 48°C umfaßt einen breiten Temperaturbereich, der zwei Maxima bei 45°C und 52°C hat. Zwischen dem Bereich um 48°C und dem Übergang bei 65°C hat die Absorption zwar ein Minimum, aber auf relativ hohem Niveau. Bei etwa 80°C – noch im Bereich des Übergangs bei 65°C – ist ein weiteres Maximum zu erkennen. Die Hauptübergangsbereiche 48°C und 65°C liegen 17°C auseinander und ihre Maxima ha-

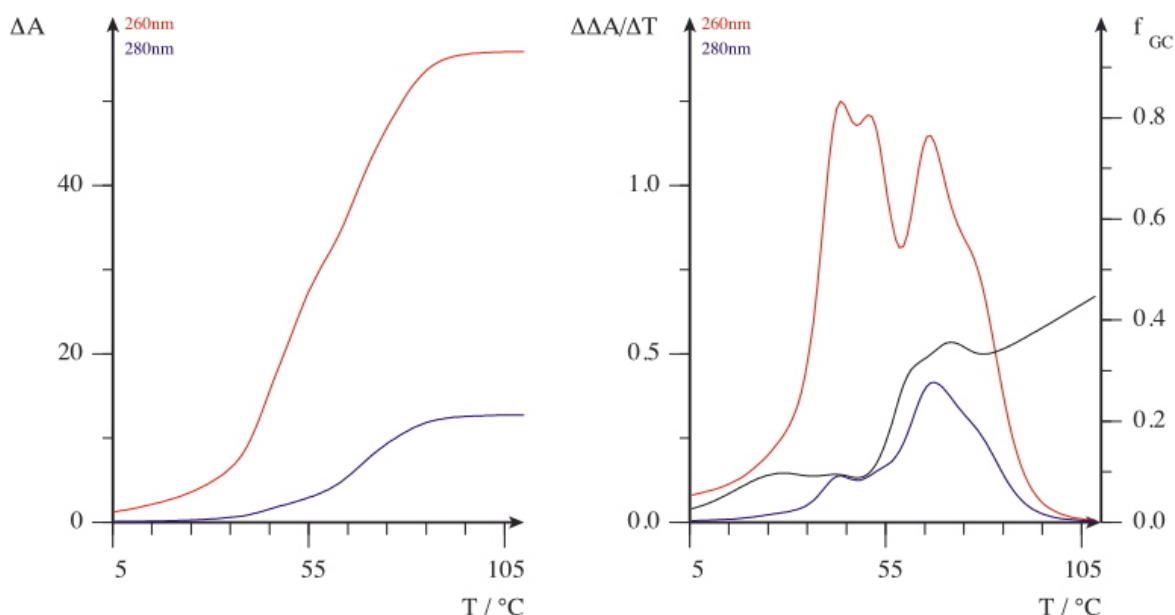


Abbildung 3.6: **Theoretische Schmelzkurve des Transkripts (-86/+131).** Die theoretische Schmelzkurve des Transkripts (-86/+131) in integrierter (links) und differenzierter (rechts) Form. Die Berechnung erfolgte mit dem Programm **Linall** für eine Ionenstärke von 1 M NaCl bei 5–105°C.

ben ähnlich hohe Werte. Das ist ein den experimentellen Daten aus der TGGE-Analyse vergleichbarer Abstand (Abb. 3.5; Übergänge bei 25 und 40°C → 15°C Abstand). Die Stabilisierung durch die Ionenstärke von 1 M NaCl bei der berechneten Kurve gegenüber dem TGGE-Experiment mit 20 mM Na₂SO₄ umfaßt etwa 25°C. Die Übergänge 25°C zu 48°C und 40°C zu 65°C können somit durchaus korrelieren. Der Übergang bei 25°C ist auch in der experimentellen Schmelzkurve zu finden. Der ausgesprochen steile Übergang bei 59°C könnte mit dem nachgelagerten Übergang bei 80°C in der theoretischen Kurve korrelieren. Der Vergleich der theoretischen und experimentellen Kurve zeigt aber einige Aspekte, die dagegen sprechen, daß die Schmelzkurven in Theorie und Experiment auf die gleiche Struktur zurückzuführen sind. Am auffälligsten ist der Kurvenverlauf selbst. Im Experiment ist der Übergang bei 25°C breit und flach (1/4 der Absorptionsänderung des 2. Übergangs). Der Übergang bei 48°C in der theoretischen Kurve ist zwar ebenfalls breit, da hier mehrere Übergänge liegen (zwei Maxima bei 45°C und 52°C), zeigt aber eine größere Absorptionszunahme als der zweite Übergang bei 65°C. Weiterhin sieht man beim Vergleich der beiden Anregungswellenlängen 260 nm (rot) und 280 nm (blau), daß die theoretische Kurve bei 280 nm (Absorptionsmaximum G:C Basenpaare) bei 48°C ein deutliches Maximum hat. Im Gegensatz dazu ist der Übergang bei 25°C in der experimentellen Kurve fast ausschließlich bei 260 nm zu beobachten. Außerdem erreichen die Werte der Absorption bei beiden Wellenlängen im Experiment ähnlich hohe

Werte, während die theoretische Schmelzkurve deutlich geringere Werte der Absorption für 280 nm vorhersagt. Der Übergang bei 65 °C ist sehr breit und hat keinen korrespondierenden Übergang im Experiment. Inwieweit der theoretische Übergang bei 80 °C dem experimentellen bei 59 °C vergleichbar ist, läßt sich aufgrund der Lage, nachgelagert im Bereich des Maximums bei 65 °C, nicht sagen.

Der Vergleich von experimenteller (Abb. 3.5) und theoretischer (Abb. 3.6) Schmelzkurve zeigt Übergänge, die in der Lage ihrer T_M -Werten korrelieren. Auch die allgemeine Feststellung, daß am 1. Übergang weniger G:C-Basenpaare beteiligt sind als am 2. Übergang, stimmt für Experiment und Theorie. Allerdings hat der vorhergesagte Kurvenverlauf aufgrund der Breite, Höhe und allgemeinen Form seiner Maxima keine Ähnlichkeit mit der experimentellen Schmelzkurve. Für das Transkript (-86/+131) werden die theoretischen Daten nur unzureichend von den experimentellen Daten unterstützt. Die Lage der Absorptionsmaxima ist in Experiment und Theorie teilweise vergleichbar, wohingegen der Kurvenverlauf sowie die Höhe und Breite der Maxima keine Gemeinsamkeiten aufweisen. Auch die experimentellen Daten von TGGE-Analyse (Abb. 3.3) und optischer Schmelzkurve (Abb. 3.5) lassen sich nicht eindeutig korrelieren.

3.2.3 Chemische Sekundärstrukturanalyse des 5'-Endes der psbA mRNA mit DEPC

Um zu zeigen, ob verschiedene Kationen zu Änderungen in der Sekundärstruktur des Transkripts (-86/+131) führen, wurde eine Sekundärstrukturanalyse mit DEPC (Diethylpyrocarbonat) in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen an KCl und MgCl₂ durchgeführt. DEPC modifiziert bei neutralem pH Wert einzelsträngig vorliegende Adenosinnukleotide, die auch durch Stapelwechselwirkungen strukturiert sein können, am Stickstoff N7 des Imidazolrings und erlaubt eine anschließende Spaltung mit Anilin an dieser Position. Auch Adenosinnukleotide, die an endständigen Helixbasenpaaren beteiligt sind, können modifiziert werden.

Die Modifizierung erfolgte unter verschiedenen Salzbedingungen an 5'-endmarkierten *in vitro* Transkripten, deren Spaltprodukte auf einem Sequenziergel nukleotidgenau zugeordnet werden konnten. Die Autoradiographie eines solchen Experiments ist in Abb. 3.7 gezeigt. Die rechte Spur zeigt die mit H₂O statt DEPC behandelte Kontrolle. Die ersten drei Spuren von links zeigen die Modifikation mit DEPC bei steigender KCl-Konzentration (50, 100 und 500 mM KCl). Die sich anschließenden vier Spuren zeigen die DEPC-Modifikation mit 100 mM KCl und steigender MgCl₂-Konzentration (0.5, 1, 5, 10 mM MgCl₂). Es ist ein charakteristisches Modifikationsmuster des Transkripts (-86/+131) zu erkennen. Bei keiner der verwendeten Salzbedingungen zeigt sich jedoch eine Veränderung. Weder treten neue Signale auf, noch werden vorhandene Signale schwächer bzw. stärker in Abhängigkeit steigender KCl- oder MgCl₂-Konzentration.

Das Transkript wird an den Positionen 28, 48, 56, 62–64, 67–69, 71–73, 76/77, 84 und 90 modifiziert. Die Modifizierungen an Positionen >90 nt können aufgrund der

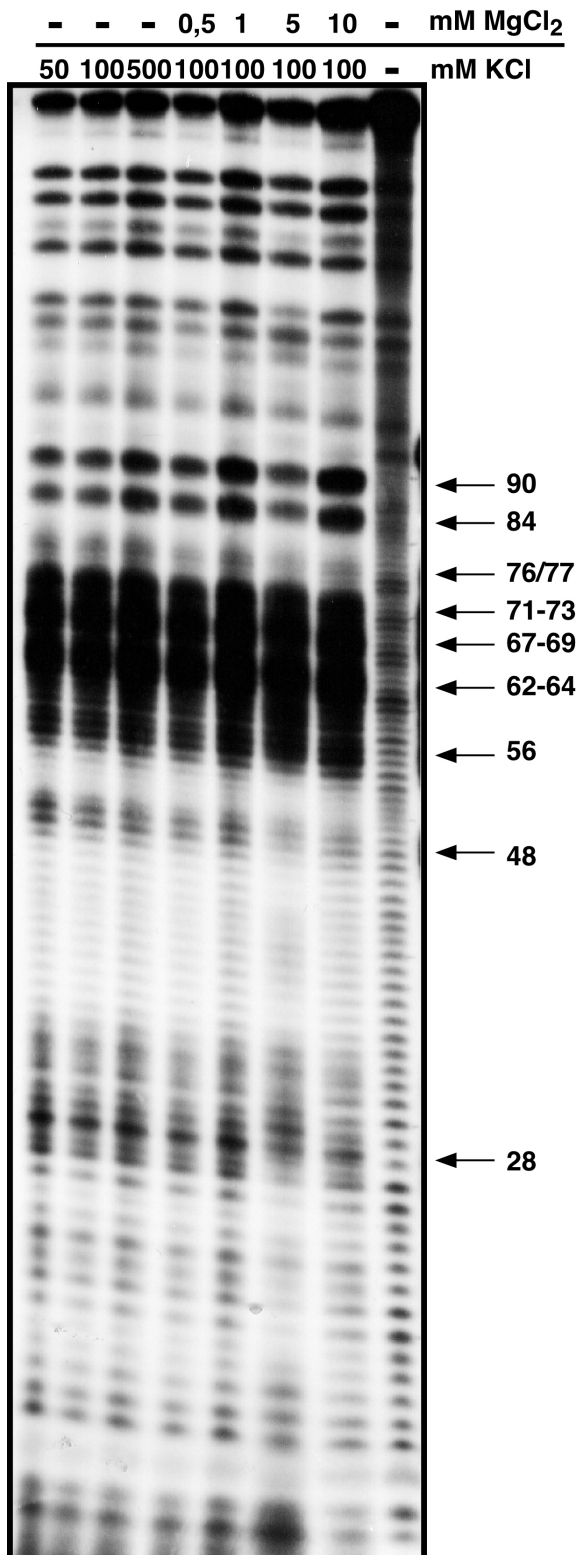


Abbildung 3.7: **Sekundärstruktur-analyse des Transkripts (-86/+131) mit DEPC.** Die Autoradiographie zeigt gelelektrophoretisch aufgetrennte Fragmente des 5'-endmarkierten Transkripts (-86/+131) nach DEPC-Behandlung und anschließender Spaltung mit Anilin. Es wurden Reaktionen mit H₂O statt DEPC (Kontrolle; keine zugesetzten Salze) und in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen an KCl und MgCl₂ gemacht. Gelbedingungen: 8% PAA (Vernetzungsgrad 19:1), 1×TBE und 7 M Urea.

Auflösung nicht mehr exakt zugeordnet werden. Man erkennt aber, daß sie alle scheinbar mit Signalen in der Kontrolle (rechte Spur) korrespondieren. Daher ist hier nicht klar, ob es sich um Modifizierungen oder Hintergrund handelt. In Abb. 3.8 sind die Modifizierungen durch DEPC in die thermodynamisch optimale Sekundärstruktur² eingetragen. Für die Berechnung wurde eine Temperatur von 45 °C gewählt, um den Unterschied in der Ionenstärke zwischen Berechnung und Experiment auszugleichen. Die gefundenen Modifizierungen passen gut zu der Sekundärstruktur, aber für über die Hälfte der Sequenz – insbesondere dem stärker strukturierten Teil – konnten die Signale nicht zugeordnet werden. Daher kann diese Struktur nur mit Einschränkungen als experimentell bestätigt angesehen werden.

psbA 5'-Ende (-86/+131)

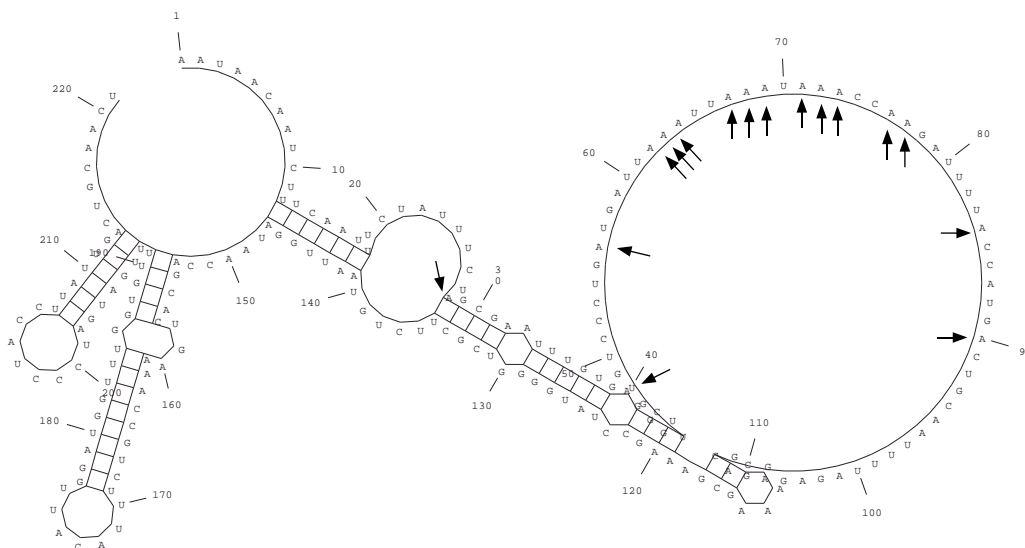


Abbildung 3.8: **Theoretische, thermodynamisch optimale Sekundärstruktur des Transkripts (-86/+131).** Die Pfeile kennzeichnen die Stellen, die bei Raumtemperatur durch DEPC modifiziert werden. Die Berechnung erfolgte mit dem Programm **LinAll** für eine Ionenstärke von 1 M NaCl bei 45 °C.

²Alle in dieser Arbeit gezeigten Sekundärstrukturen sind theoretische, thermodynamisch optimale Sekundärstrukturen, die mit dem Programm **LinAll** berechnet wurden. Das Programm **LinAll** arbeitet nach einem Energieminimierungsalgorithmus (siehe dazu auch Kap. 2.3.4, S. 35 und [138]).

Die thermodynamische Strukturanalyse des Transkripts (-86/+131), das das 5'-Ende der *psbA* mRNA umfaßt, lieferte keine Hinweise auf ein Mg^{2+} -abhängiges Strukturelement. In der TGGE-Analyse konnten zwar schwache Effekte auf das Laufverhalten durch Mg^{2+} -Ionen beobachtet werden, die Sekundärstrukturanalyse mit DEPC legt jedoch nahe, daß hier lediglich vorhandene Strukturelemente stabilisiert bzw. destabilisiert werden, sich an der Struktur aber nichts ändert. Die Interpretation der Daten gestaltet sich schwierig, da das beobachtete Laufverhalten in der TGGE-Analyse nur teilweise mit der optischen Denaturierungskurve korreliert. Die theoretische Schmelzkurve kann ebenfalls nur in allgemeinen Punkten mit der experimentellen in Einklang gebracht werden. Da in dem Transkript (-86/+131) keine Hinweise auf Mg^{2+} -sensitive Strukturelemente gefunden wurden und es auch keine Anhaltspunkte dafür gibt, welcher andere Sequenzabschnitt ein solches enthalten könnte, wurden im weiteren Methoden gewählt, bei denen die Volllänge der *psbA* mRNA bzw. das Transkript (-86/+822) analysiert werden konnten. Ziel war es, andere Sequenzbereiche zu finden und einzugrenzen, die mit Mg^{2+} -Ionen in Wechselwirkung treten können. Insbesondere sollte dabei die Frage berücksichtigt werden, ob – wie von der theoretischen, thermodynamisch optimalen Struktur vorhergesagt (siehe Abb. 3.21, S. 75) – eine *long range* Wechselwirkung in der Sekundärstruktur der *psbA* mRNA eine Rolle spielt.

3.3 UV-Quervernetzung im *in vitro* Transkript (-86/+822)

Die bisher präsentierten Daten zeigen, daß Fragmente der *psbA* mRNA, die das 5'- und 3'-Ende umfassen, keine Hinweise auf eine Mg^{2+} -abhängige Strukturänderung geben. Demzufolge stellte sich die Frage, ob doch eine *long range* Wechselwirkung von 5'- und 3'-Ende der mRNA ein relevantes Strukturelement sein könnte, wie es die theoretische, thermodynamisch optimale Sekundärstruktur vorhersagt (siehe als Beispiel Abb. 3.21, S. 75). Zunächst sollte mit Hilfe UV-Licht induzierter Quervernetzung von RNA die Frage beantwortet werden, ob es überhaupt Hinweise auf eine solche Struktur gibt.

Bei der Bestrahlung von RNA mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm werden die delokalisierten π -Elektronen der Basen angeregt. Wenn zwei Basen in geeigneter Geometrie zueinander stehen, kann es zu einer kovalenten Verknüpfung - einer Quervernetzung - kommen. Dabei weisen nicht-kanonische Basenpaare, die in Tertiärstrukturen oder in Loops ausgebildet werden, eine besonders hohe Verknüpfungseffizienz auf [17]. Durch die Quervernetzung wird die RNA partiell zirkularisiert und kann in einer denaturierenden Gelelektrophorese durch ihre starke Retardation gegenüber der linearen Form identifiziert werden.

Als Modelltranskript wurde der Sequenzbereich (-86/+822) anstelle der Volllänge der mRNA ausgewählt. Dieses *in vitro* Transkript zeigte bei spezifischer Hydrolyse mit Pb^{2+} -Ionen alle Spaltstellen der Volllänge [143] und ist einfach quantitativ zu synthe-

tisieren. Das Transkript ist mit 908 nt so lang, daß Verknüpfungen in der Sequenz benachbarter Basen nur eine sehr schwache Retardation in einer denaturierenden Gelelektrophorese hervorrufen sollten, während die Verknüpfung in der Sequenz entfernter Bereiche zu einem stark verzögerten RNA-Zirkel führen sollte. In Abb. 3.9 ist ein solches Experiment gezeigt. Die UV-Quervernetzung wurde bei steigender Bestahlungsdauer mit und ohne Zugabe von $MgCl_2$ durchgeführt, um eventuelle Unterschiede in Abhängigkeit von Mg^{2+} -Ionen festzustellen.

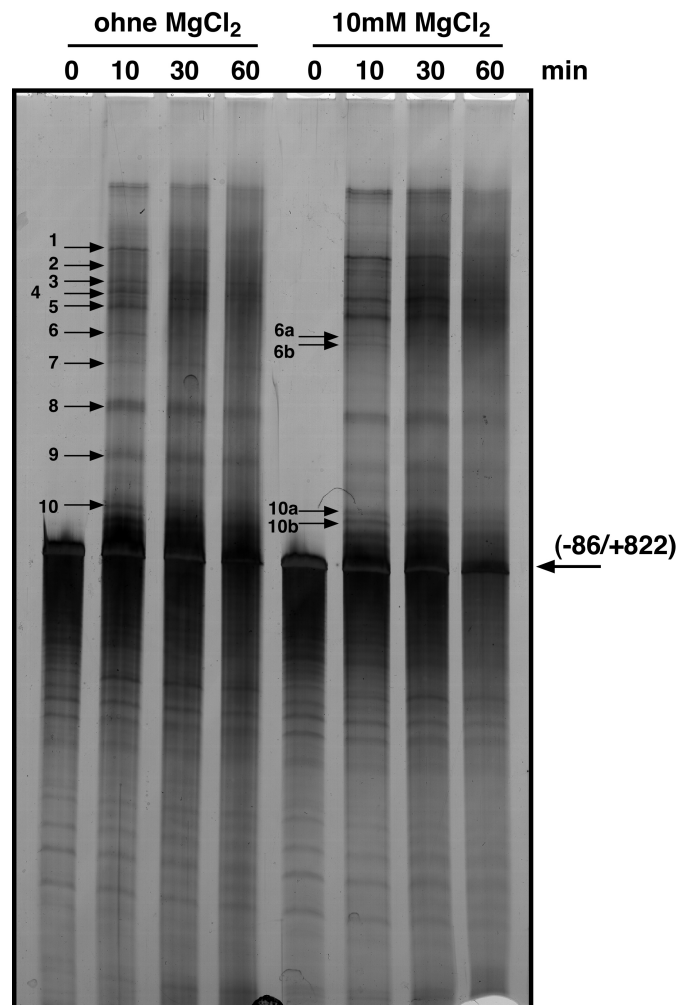


Abbildung 3.9: **UV-induzierte Quervernetzung in Transkript (-86/+822)**. Das Transkript (-86/+822) wurde in $1\times TE$ bzw. $1\times TE$ und $10\text{ mM } MgCl_2$ 0, 10, 30 und 60 Minuten mit 254 nm bestrahlt und anschließend in einem $3,5\%$ igen PAA-Gel (Vernetzungsgrad 30:0,8; $1\times TBE$, 8 M Urea) elektrophoretisch aufgetrennt und silbergefärbt. Das lineare Transkript sowie die retardierten Banden (Nr. 1–10) sind mit Pfeilen markiert.

Bereits bei 10 Minuten Bestrahlung zeigte sich eine gute Quervernetzungseffizienz, die bei 30 Minuten maximal war. Dagegen zeigt die RNA nach 60 Minuten bereits eine deutliche Degradation. Es ist eine Vielzahl diskreter, zum Teil stark verzögerter Banden (Pfeile Nr. 1–10) zu sehen, was auf definierte Verknüpfungstellen in der RNA schließen läßt. Bei einer unspezifischen Verknüpfung wäre statt diskreter Banden ein Schmier oberhalb der Bande des eingesetzten Transkripts zu sehen. Die besonders starke Verzögerung mehrerer Banden (Pfeile Nr. 1–5) gab weiterhin den gesuchten Hinweis auf eine *long range* Wechselwirkung, da eine so starke Retardation nur durch große zirkularisierte Bereiche hervorgerufen werden kann.

Ein Vergleich der UV-Quervernetzung mit und ohne $MgCl_2$ zeigte leichte Unterschiede. Generell waren die verzögerten Hauptbanden in Anwesenheit von $MgCl_2$ etwas stärker ausgeprägt gegenüber den schwächeren Banden (Pfeile Nr. 1, 4, 5) und einige Banden verschwanden (Pfeile Nr. 3 und 7) völlig. Zwei Banden sind nur in Anwesenheit von $MgCl_2$ zu beobachten (Pfeile Nr. 6b und 10b). Sie liegen jeweils in der Nähe etwas stärker verzögerter Banden (Pfeile Nr. 6/6a und 10/10a), was auf eine partielle Verschiebung der Struktur durch Mg^{2+} -Ionen im Bereich dieser Quervernetzung hindeutet.

Diese Daten weisen auf eine *long range* Wechselwirkung in der *psbA* mRNA hin. Weiterhin konnte eine Mg^{2+} -Abhängigkeit der UV-Quervernetzung gezeigt werden. Die Vielzahl der retardierten Banden und ihre relativ geringe RNA-Menge im Verhältnis zum eingesetzten Transkript machte jedoch eine quantitative Aufreinigung der UV-Quervernetzungsprodukte für eine genaue Lokalisation der UV-Verknüpfungsstellen unmöglich, so daß die an der *long range* Wechselwirkung beteiligten Bereiche der *psbA* mRNA mit anderen Methoden untersucht werden mußten.

3.4 Analyse der *psbA* mRNA durch spezifische Hydrolyse mit Pb^{2+} -Ionen

3.4.1 Mechanismus der spezifischen Hydrolyse von RNA mit Pb^{2+} -Ionen

Zur weiteren Analyse der RNA- Mg^{2+} -Wechselwirkung wurde ein indirekter biochemischer Ansatz gewählt: die spezifische Hydrolyse von RNA mit Pb^{2+} -Ionen. Generell kann man RNA mit allen zweiwertigen Kationen (Me^{2+}) hydrolytisch spalten, wenn der pH Wert nahe dem pK_a Wert des verwendeten Ions liegt. Diese Methode eignet sich zur Identifikation Me^{2+} -sensitiver Elemente, wie an verschiedenen Beispielen gezeigt werden konnte (Hepatitis- δ -Ribozym [99], ribosomale RNAs [120, 170], Gruppe I Introns [156], Hammerkopf-Ribozym [33], RNase P aus *E. coli* [18]). Am besten untersucht ist die Spaltung der tRNA^{Phe} aus Hefe [19], an deren Beispiel auch der Mechanismus dieser Spaltung, wie er in Abb. 3.10 schematisch dargestellt ist, beschrieben wurde.

Das in Lösung vorkommende hydratisierte Pb^{2+} -Ion ist bei einem pH Wert, der na-

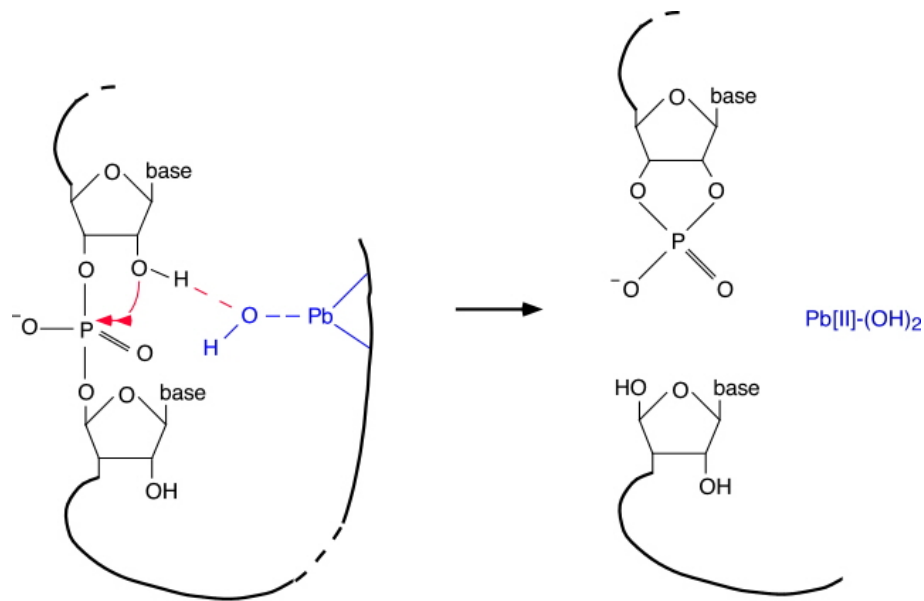


Abbildung 3.10: **Mechanismus der spezifischen Hydrolyse von RNA mit Pb^{2+} -Ionen nach Brown et al. [19]**

he seinem pK_a Wert (7,7) liegt, teilweise deprotoniert. Es entsteht ein Bleihydrat-Ion, das – wenn es an geeigneter Stelle an eine RNA gebunden ist – ein Proton von der Hydroxylgruppe einer räumlich nahegelegenen Ribose des Zuckerphosphatrückgrats abziehen kann. Es folgt ein nukleophiler Angriff des entstehenden $2' O^-$ der Ribose auf das Zuckerphosphatrückgrat, was die Spaltung des Rückgrats an dieser Stelle zur Folge hat. Für eine solche Spaltung müssen verschiedene Bedingungen erfüllt sein:

- Der pH Wert der Lösung muß nahe dem pK_a des verwendeten Ions sein.
- Das gebundene Bleihydrat muß in der richtigen Orientierung und in geeignetem Abstand (ca. 6 Å) zur Ribose stehen.
 - Daraus folgt, daß die Bindestelle des Pb^{2+} -Ions und die Spaltstelle sich in räumlicher Nähe – nicht aber unbedingt in sequentieller Nähe – befinden müssen.
 - Und, daß nicht jedes gebundene Pb^{2+} -Ion zu einer Spaltung führt.

Da die Hydrolyse von RNA mit Pb^{2+} -Ionen von der RNA-Struktur abhängt, ist es möglich anhand einer Veränderung im Spaltungsmuster unter verschiedenen Reaktionsbedingungen oder bei unterschiedlich strukturierten RNAs indirekte Aussagen über die Struktur an den Spaltstellen treffen. Im folgenden wurde diese Methode bei verschiedenen 5'-verkürzten *in vitro* Transkripten der *psbA* mRNA, für die in Abhängigkeit

von ihrer Länge unterschiedliche Sekundärstrukturen vorhergesagt wurden, angewendet. Weiterhin wurde die Methode zur Analyse der endogenen *psbA* mRNA *in organello* benutzt.

3.4.2 Spezifische Hydrolyse mit Pb^{2+} -Ionen 5'-seitig verkürzter *in vitro* Transkripte der *psbA* mRNA

Die spezifische Hydrolyse von RNA mit Pb^{2+} -Ionen ist stark abhängig von der Struktur des zu untersuchenden Moleküls. Ein an RNA gebundenes Pb^{2+} -Ion kann nur eine Spaltung des Zuckerphosphatrückgrats induzieren, wenn es räumlich in geeigneter Position zur Ribose steht (siehe Abb 3.10). Dementsprechend sollte sich das Muster der Pb^{2+} -Spaltung einer RNA ändern, wenn sich deren Struktur ändert. Bei kürzeren RNAs, deren Struktur gut charakterisiert ist, kann diese Strukturänderung z. B. durch die Salzbedingungen, den pH Wert oder schnelle bzw. langsame Renaturierung erreicht werden. Bei langen Molekülen – wie der *psbA* mRNA – liefert dieses Vorgehen keine eindeutigen Daten, so daß man hier auf andere Wege zur Änderung der Sekundärstruktur zurückgreift: die Verkürzung der RNA vom 5'- oder 3'-Ende her. Mit diesem Vorgehen kann insbesondere auch die Frage beantwortet werden, ob die Sekundärstruktur eine *long range* Wechselwirkung zwischen 5'- und 3'-Ende ausbildet. Eine Verkürzung, die die Ausbildung der postulierten *long range* Wechselwirkung ausschließt, sollte zum Verlust von Pb^{2+} -Spaltstellen führen, die in längeren Transkripten, die die *long range* Wechselwirkung erlauben, vorkommen, und gegebenenfalls sollten neue Pb^{2+} -Spaltstellen auftreten.

Frühere Experimente, bei denen die *psbA* mRNA 3'-seitig verkürzt wurde, gaben bereits Hinweise auf eine minimale Sequenzlänge, die *in silico* gerade noch die Ausbildung der *long range* Wechselwirkung erlaubt [143]. Auf deren Grundlage wurde hier das 3'-seitig verkürzte *in vitro* Transkript (-86/+822) als Basis für die 5'-seitige Verkürzung gewählt. Diesem Transkript fehlen ca. 300 nt am 3'-Ende. Es erlaubt aber noch die in der theoretischen Sekundärstruktur vorhergesagte *long range* Wechselwirkung, die von den Bereichen [5': -86(1) bis +34(120)] und [3': +753(839) bis +822(908)] gebildet wird (siehe die Struktur des *in vitro* Transkripts (-86/+822) in Abb. 3.12, S. 63 und der Volllänge der *psbA* mRNA in Abb. 3.21, S. 75). Das Transkript (-86/+822) und die Volllänge enthalten beide eine Pb^{2+} -Spaltstelle an Position -5(81), die in einem Loop, der Bestandteil der *long range* Wechselwirkung ist, liegt und die bei weiterer 3'-seitigen Verkürzung verschwindet. Diese Spaltstelle kann als Indikator für die *long range* Wechselwirkung genutzt werden. Weiterhin enthält das Transkript (-86/+822) einen GAAA-Tetraloop an Position [+22(108) bis +31(117)], der unabhängig von der Sequenzlänge gebildet wird. GAAA-Tetraloops sind bekannt dafür, daß hier zweiwertige Kationen binden können [96, 131]. Im Fall des Transkripts (-86/+822) konnte eine Spaltung durch Pb^{2+} -Ionen im Bereich des Tetraloops gezeigt werden [143].

Auf der Grundlage des *in vitro* Transkripts (-86/+822) wurden hier drei 5'-seitig verkürzte Transkripte vergleichend auf Unterschiede in ihrem Pb^{2+} -Spaltmuster un-

tersucht. Die theoretischen Sekundärstrukturen der ausgewählten Transkripte sind in Teil A der Abbildungen **3.12** (-86/+822), **3.14** (-15/+822) **3.16** (+18/+822) und **3.18** (+115/+822) dargestellt. Die beiden längeren Transkripte – (-86/+822) und (-15/+822) – können danach eine *long range* Wechselwirkung ausbilden, wobei diese bei (-15/+822) allerdings deutlich weniger Basenpaare umfaßt. Die beiden kürzeren Transkripte – (+18/+822) und (+115/+822) – können diese Sekundärstruktur nicht mehr ausbilden. Aber die meisten Sequenz- bzw. Strukturbereiche der Transkripte sollten nach der theoretischen Struktur von der Verkürzung nicht beeinflußt werden.

Die Transkripte wurden mit Pb^{2+} -Ionen gespalten und die Spaltstellen anschließend mittels Primer Extension Analyse lokalisiert. Es wurden Primer gewählt, mit denen die vollständige Sequenz des Transkripts abgedeckt werden konnte (bis auf die dem Primer komplementäre Sequenz des 3'-Endes). Die Lokalisation der Spaltstellen erfolgte mit Hilfe einer Sequenzierung mit dem entsprechenden Primer. Die Autoradiographien der Primer Extension Analyse sind in Abb. **3.11**, **3.13**, **3.15** und **3.17** gezeigt und die Pb^{2+} -Spaltstellen mit Pfeilen gekennzeichnet. Alle gefundenen Spaltstellen sind in Tabelle **3.1** zusammengefaßt.

Tabelle 3.1: **Pb^{2+} -Spaltstellen der 5'-seitig verkürzten Transkripte** Die Tabelle zeigt vergleichend das Vorkommen der detektierten Pb^{2+} -Spaltstellen in den 5'-verkürzten *in vitro* Transkripten (-86/+822), (-15/+822), (+18/+822) und (+115/+822). Besonders ausgeprägte Signale wurden durch (++) , besonders schwache Signale durch (+/-) gekennzeichnet. Ein (-) steht für in diesem Transkript nicht gespaltene Positionen.

Pos.	(-86/+822)	(-15/+822)	(+18/+822)	(+115/+822)
-5	++	++		
+9	++	-		
+26	++	+		
+33	-	+	++	
+40	++	-	-	
+55	++	-	++	
+66	+	-	++	
+73/+74	++	++	++	
+105/+106	+	-	+/-	
+125	-	-	-	++
+181	++	++	++	+
+198	+	+	-	++
+214	++	++	++	++
+230	+	-	++	+
+234/+235	+	+	++	+
+278	++	+	+	+
+309	+	+	+	+
+335/+336	+	-	-	++
+340	-	-	-	++

3.4 Analyse der psbA mRNA durch spezifische Hydrolyse mit Pb^{2+} -Ionen

Pos.	(-86/+822)	(-15/+822)	(+18/+822)	(+115/+822)
+342	++	-	-	-
+345	++	++	+	++
+349	-	++	++	++
+362	++	++	++	++
+372	++	++	++	++
+379	+	-	-	-
+401	++	-	-	+
+409	++	++	+/-	++
+414	++	-	-	++
+464	-	-	-	+
+468	+	++	-	+
+488	+	++	++	+
+499	-	-	++	-
+501	-	++	+	-
+506	++	+	-	+
+510	-	-	++	+/-
+520	-	-	-	+
+526	-	-	++	+
+545	+	+	-	+
+551	-	+	++	-
+558	++	++	+/-	++
+564	++	++	++	++
+572/+573	+	-	-	-
+600	+	+	-	-
+608	-	-	+	-
+618	+	+	+	-
+634	+/-	+	-	-
+640	++	++	-	-
+645	-	++	++	+
+663	+	-	-	-
+669	++	++	++	++
+699-703	+	+	+	-
+710	+	++	-	+
+744	++	++	+	+
+753/+754	+	+/-	+	+/-
+761-763	+	+/-	+/-	+/-

Es finden sich einige Pb^{2+} -Spaltstellen die in allen vier Transkripten detektiert werden konnten: +181, +214, +234/+235, +278, +309, +345, +362, +372, +409, +488, +558, +564, +669, +744, +753/+754 sowie +761 bis +763³. Sie sind in Teil B der

³Es ist hier nur die Numerierung nach Zurawski *et al.* angegeben [176], da die entsprechende Nummerierung der theoretischen Sekundärstruktur aufgrund der unterschiedlichen 5'-Enden für alle Transkripte verschieden ist.

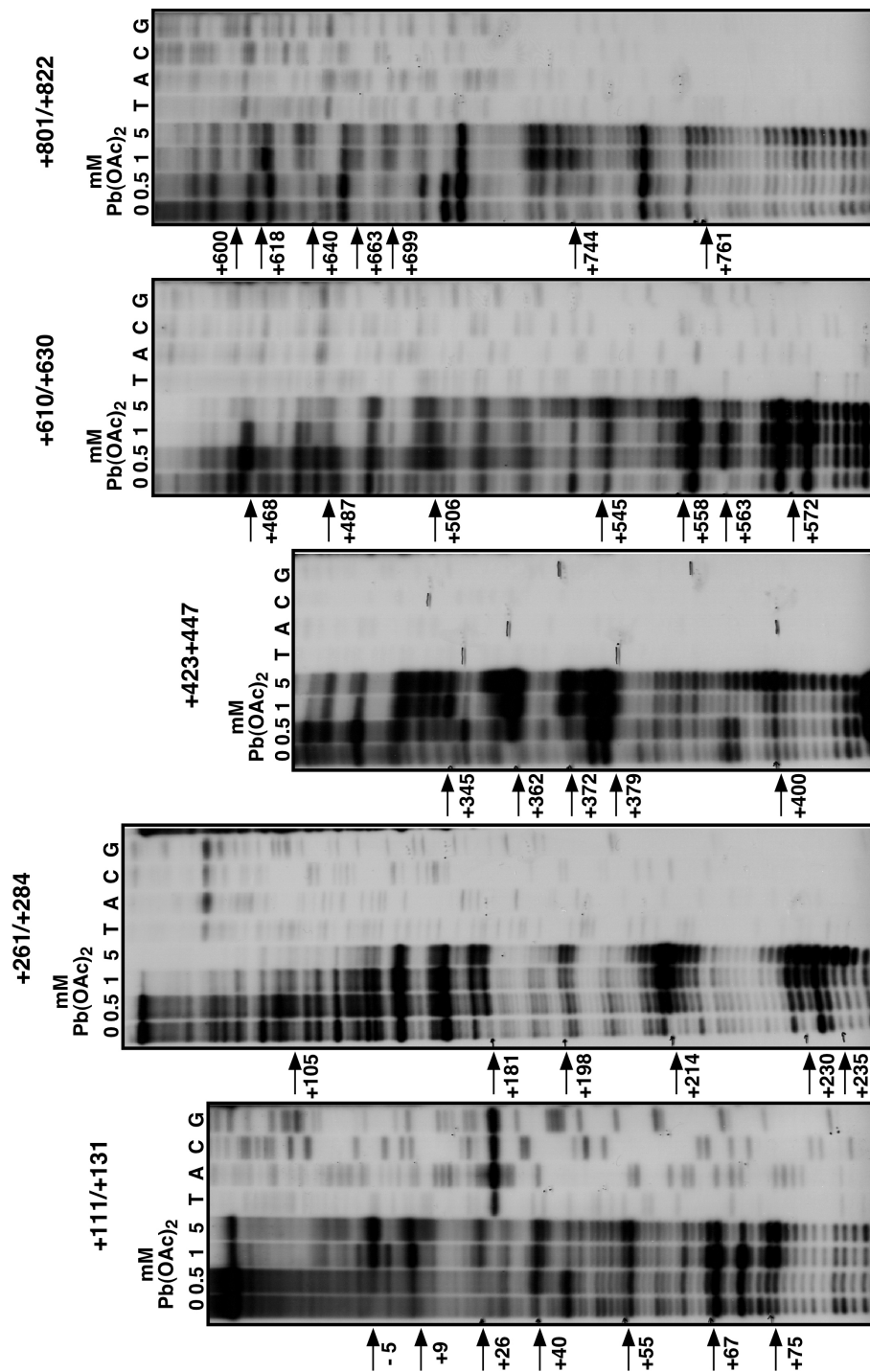


Abbildung 3.11: **Primer Extension der Pb^{2+} -Spaltfragmente des Transkripts (-86/+822).** Primer Extension Analyse mit den Primern (+111 \leftarrow +131), (+261 \leftarrow +284), (+423 \leftarrow +447), (+610 \leftarrow +630) und (+801 \leftarrow +822). Die Zuordnung der Fragmente erfolgte mittels der Sequenzierung mit dem entsprechenden Primer. Die Pfeile kennzeichnen die Pb^{2+} -Spaltfragmente, die entsprechend Zurawski *et al.* [176] numeriert sind. Die Analyse erfolgte in einem 8%igem, denaturierenden Sequenziergel (1 \times TBE, 7 M Urea).

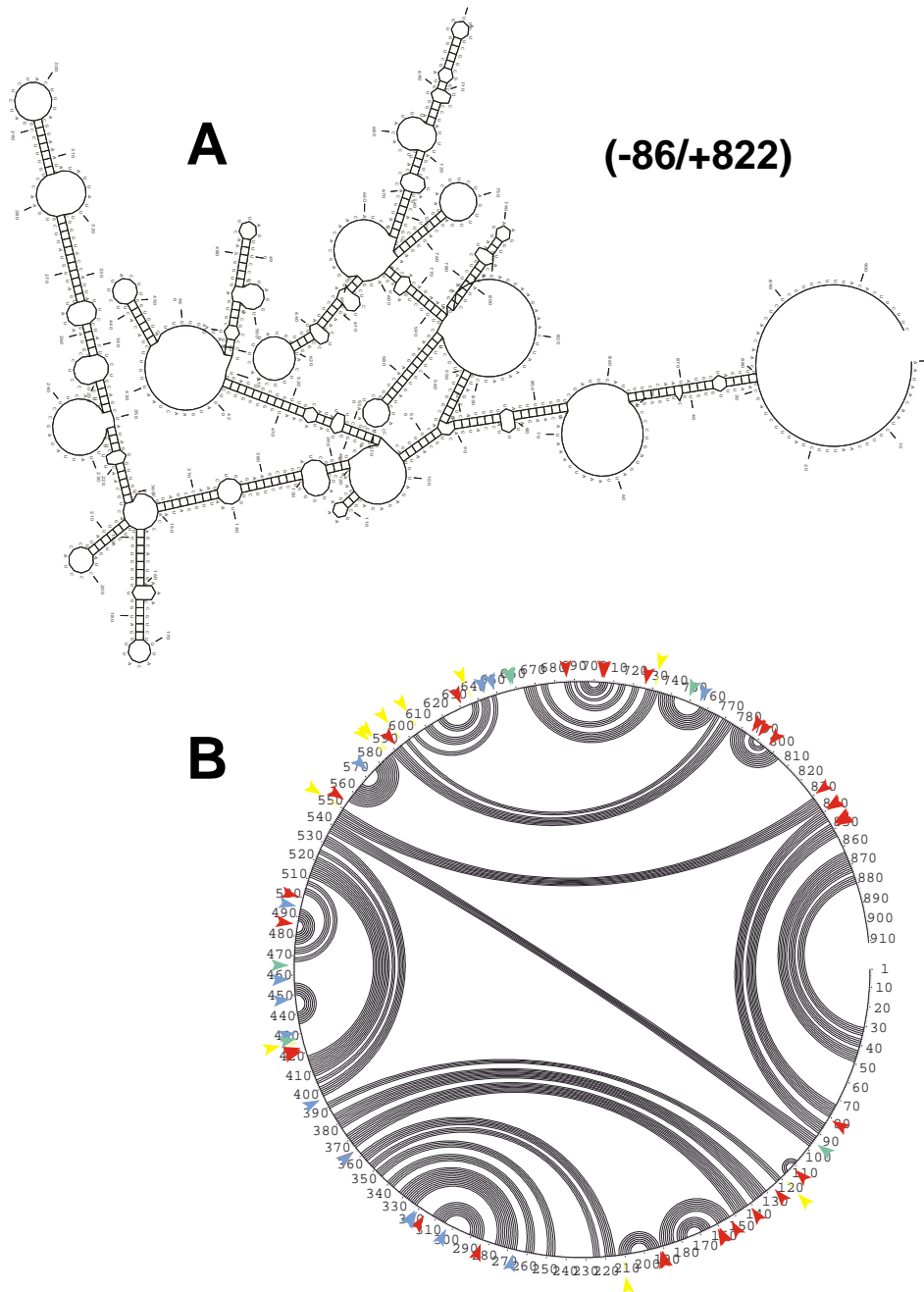


Abbildung 3.12: **Theoretische Struktur des Transkripts (-86/+822).** **A:** Die theoretische, thermodynamisch optimale Sekundärstruktur des Transkripts (-86/+822) ist hier zweidimensional als Helix-Loop-Darstellung gezeigt. **B:** Die theoretische, thermodynamisch optimale Sekundärstruktur als Kreis aufgespreitet. Die Basenpaarungen sind hier durch die Verbindungslinien zwischen zwei Basen dargestellt. Die roten Pfeile kennzeichnen alle bei dem Transkript (-86/+822) gefundenen Pb^{2+} -Spaltstellen; die blauen Pfeile kennzeichnen die Pb^{2+} -Spaltstellen, die bei allen untersuchten Transkripten gefunden wurden.

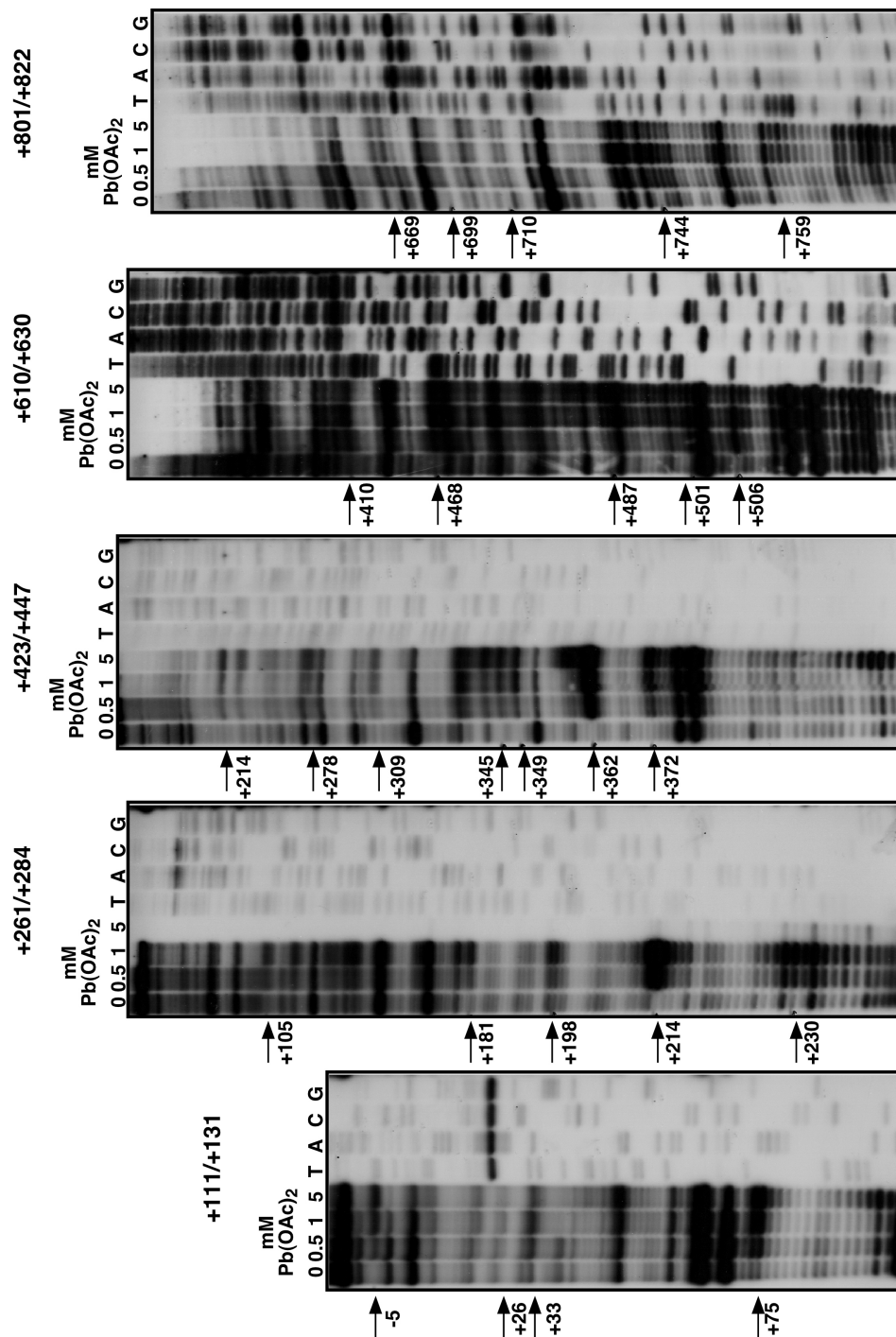


Abbildung 3.13: **Primer Extension der Pb²⁺-Spaltfragmente des Transkripts (-15/+822).** Primer Extension Analyse mit den Primern (+111←+131), (+261←+284), (+423←+447), (+610←+630) und (+801←+822). Die Zuordnung der Fragmente erfolgte mittels der Sequenzierung mit dem entsprechenden Primer. Die Pfeile kennzeichnen die Pb²⁺-Spaltfragmente, die entsprechend Zurawski *et al.* [176] numeriert sind. Die Analyse erfolgte in einem 8%igem, denaturierenden Sequenziergel (1×TBE, 7 M Urea)

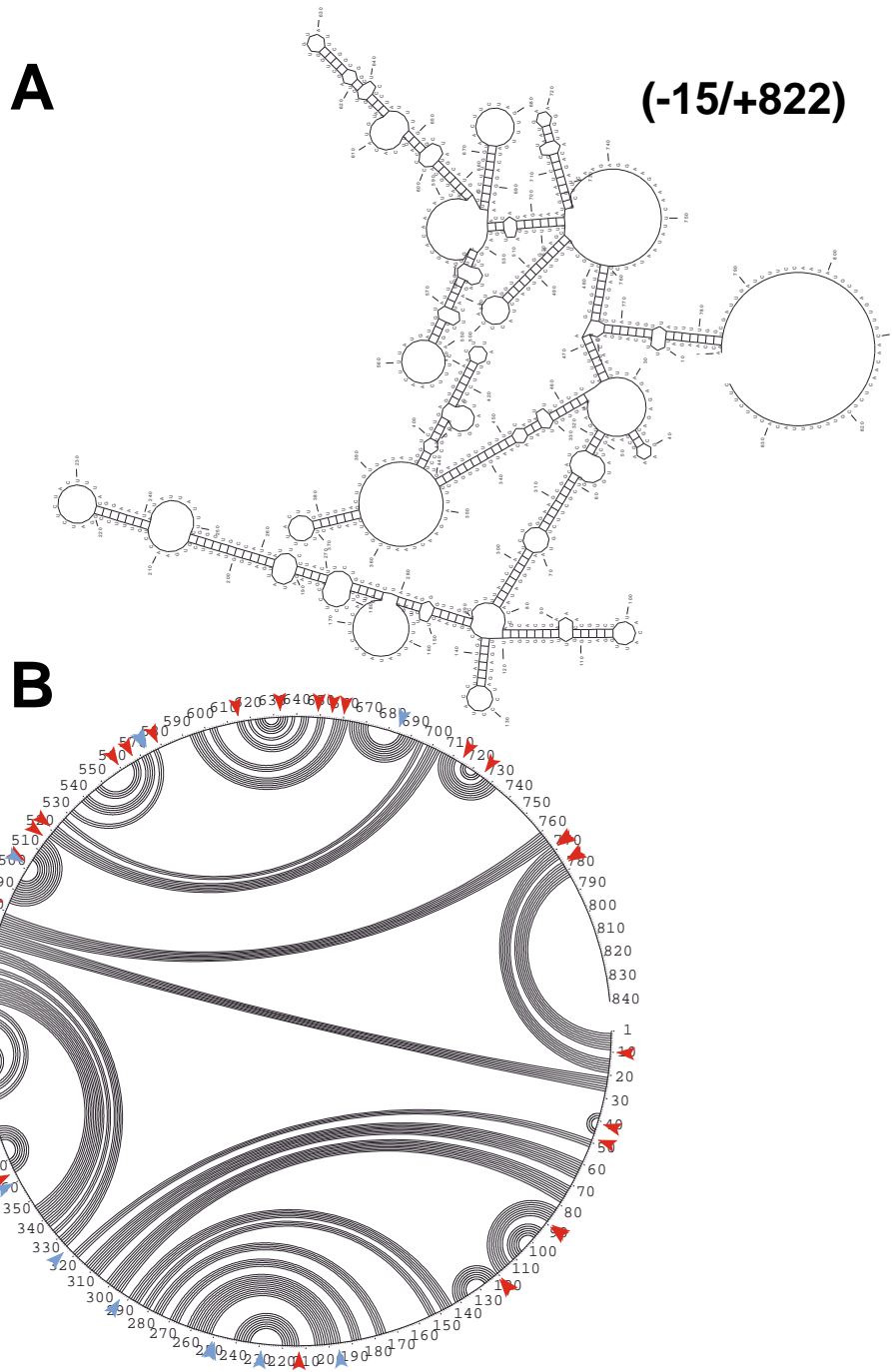


Abbildung 3.14: **Theoretische Struktur des 5'-seitig verkürzten Transkripts (-15/+822).** **A:** Die theoretische, thermodynamisch optimale Sekundärstruktur des Transkripts (-15/+822) ist hier zweidimensional als Helix-Loop-Darstellung gezeigt. **B:** Die theoretische, thermodynamisch optimale Sekundärstruktur als Kreis aufgespreitet. Die Basenpaarungen sind hier durch die Verbindungslinien zwischen zwei Basen dargestellt. Die roten Pfeile kennzeichnen alle bei dem Transkript (-15/+822) gefundenen Pb^{2+} -Spaltstellen; die blauen Pfeile kennzeichnen die Pb^{2+} -Spaltstellen, die bei allen untersuchten Transkripten gefunden wurden.

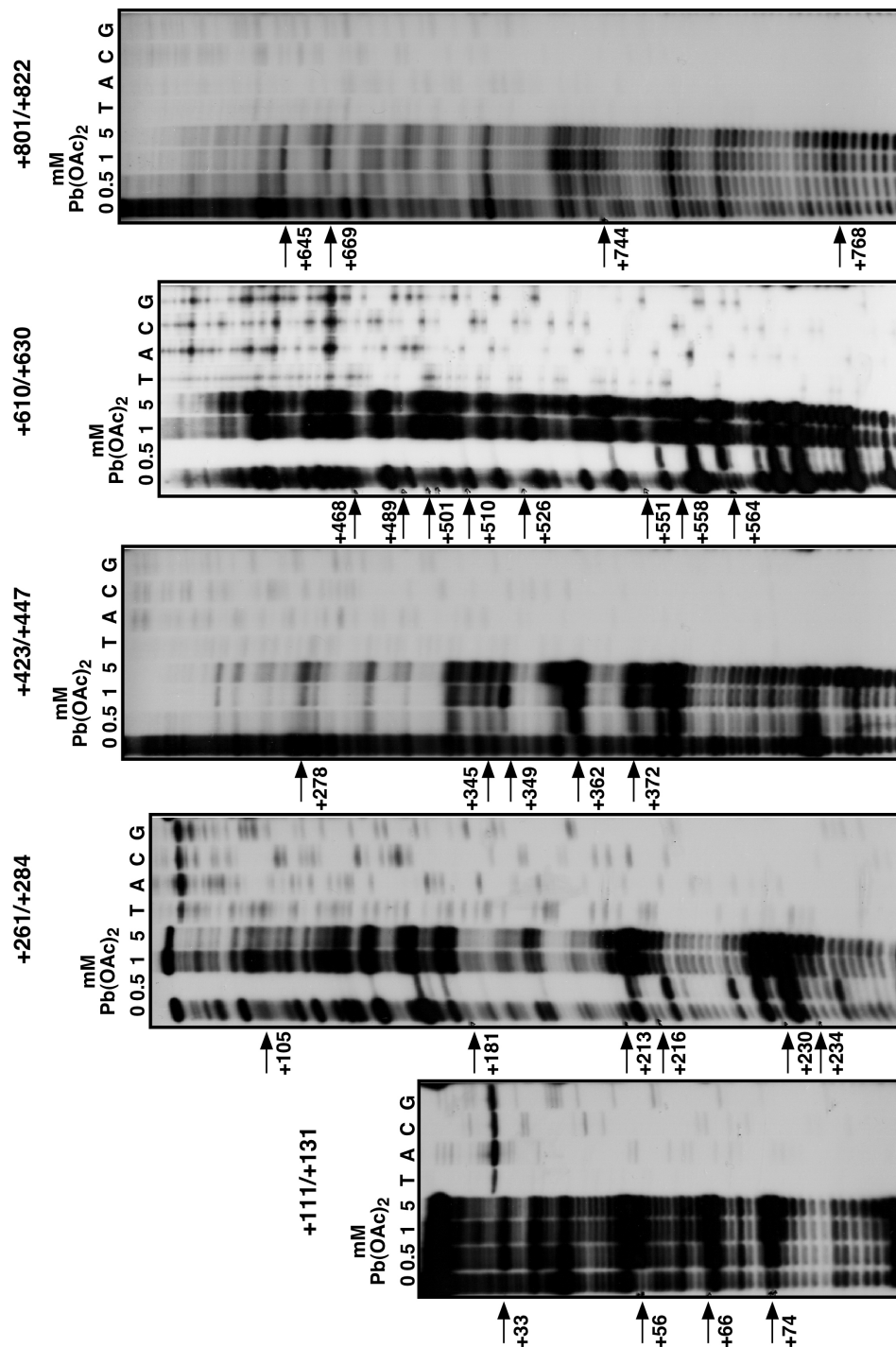


Abbildung 3.15: **Primer Extension der Pb^{2+} -Spaltfragmente des Transkripts (+18/+822).** Primer Extension Analyse mit den Primern (+111 \leftarrow +131), (+261 \leftarrow +284), (+423 \leftarrow +447), (+610 \leftarrow +630) und (+801 \leftarrow +822). Die Zuordnung der Fragmente erfolgte mittels der Sequenzierung mit dem entsprechenden Primer. Die Pfeile kennzeichnen die Pb^{2+} -Spaltfragmente, die entsprechend Zurawski *et al.* [176] numeriert sind. Die Analyse erfolgte in einem 8%igem, denaturierenden Sequenziergel (1 \times TBE, 7 M Urea)

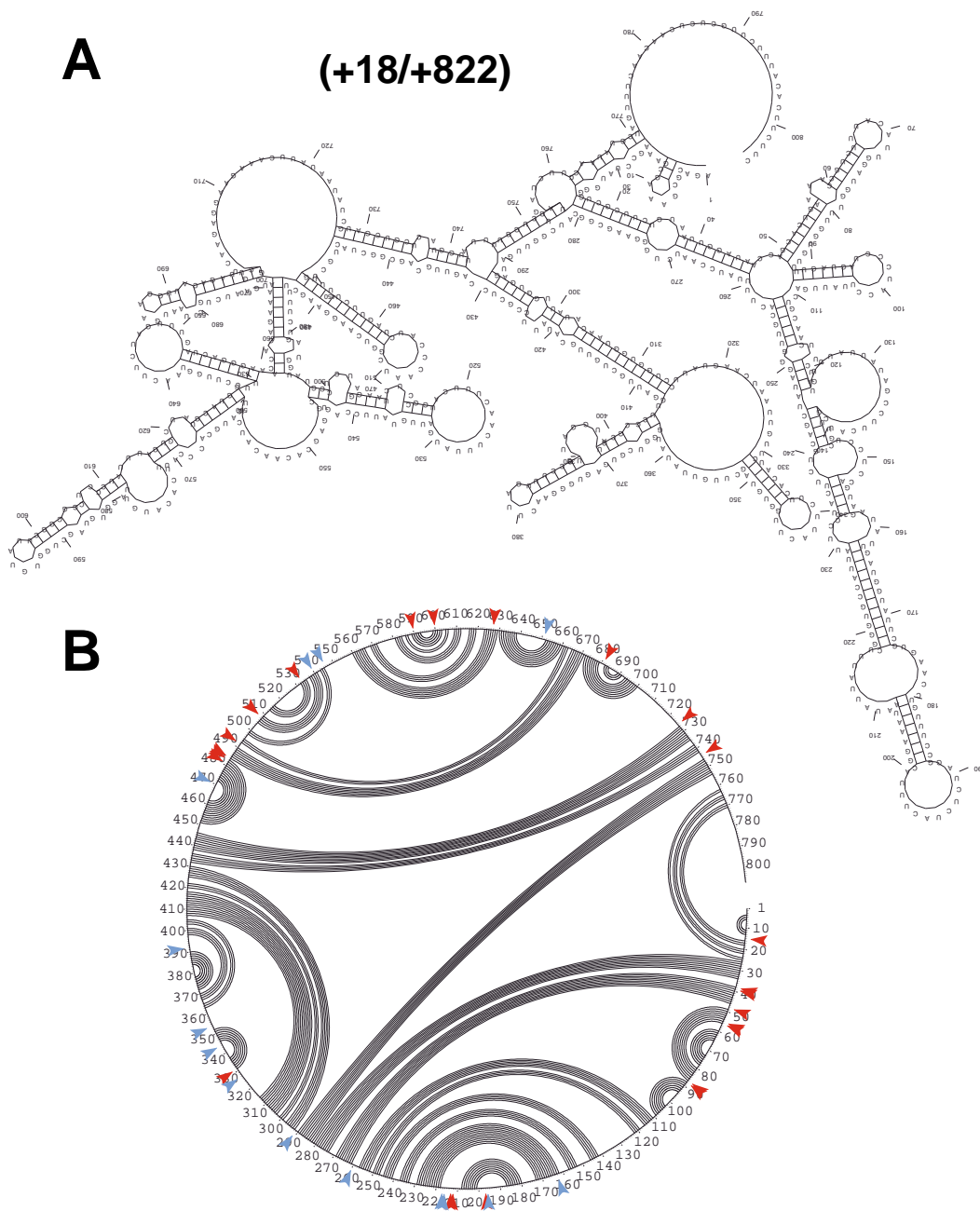


Abbildung 3.16: **Theoretische Struktur des 5'-seitig verkürzten Transkripts (+18/+822).** **A:** Die theoretische, thermodynamisch optimale Sekundärstruktur des Transkripts (+18/+822) ist hier zweidimensional als Helix-Loop-Darstellung gezeigt. **B:** Die theoretische, thermodynamisch optimale Sekundärstruktur als Kreis aufgespreitet. Die Basenpaarungen sind hier durch die Verbindungslinien zwischen zwei Basen dargestellt. Die roten Pfeile kennzeichnen alle bei dem Transkript (+18/+822) gefundenen Pb^{2+} -Spaltstellen; die blauen Pfeile kennzeichnen die Pb^{2+} -Spaltstellen, die bei allen untersuchten Transkripten gefunden wurden.

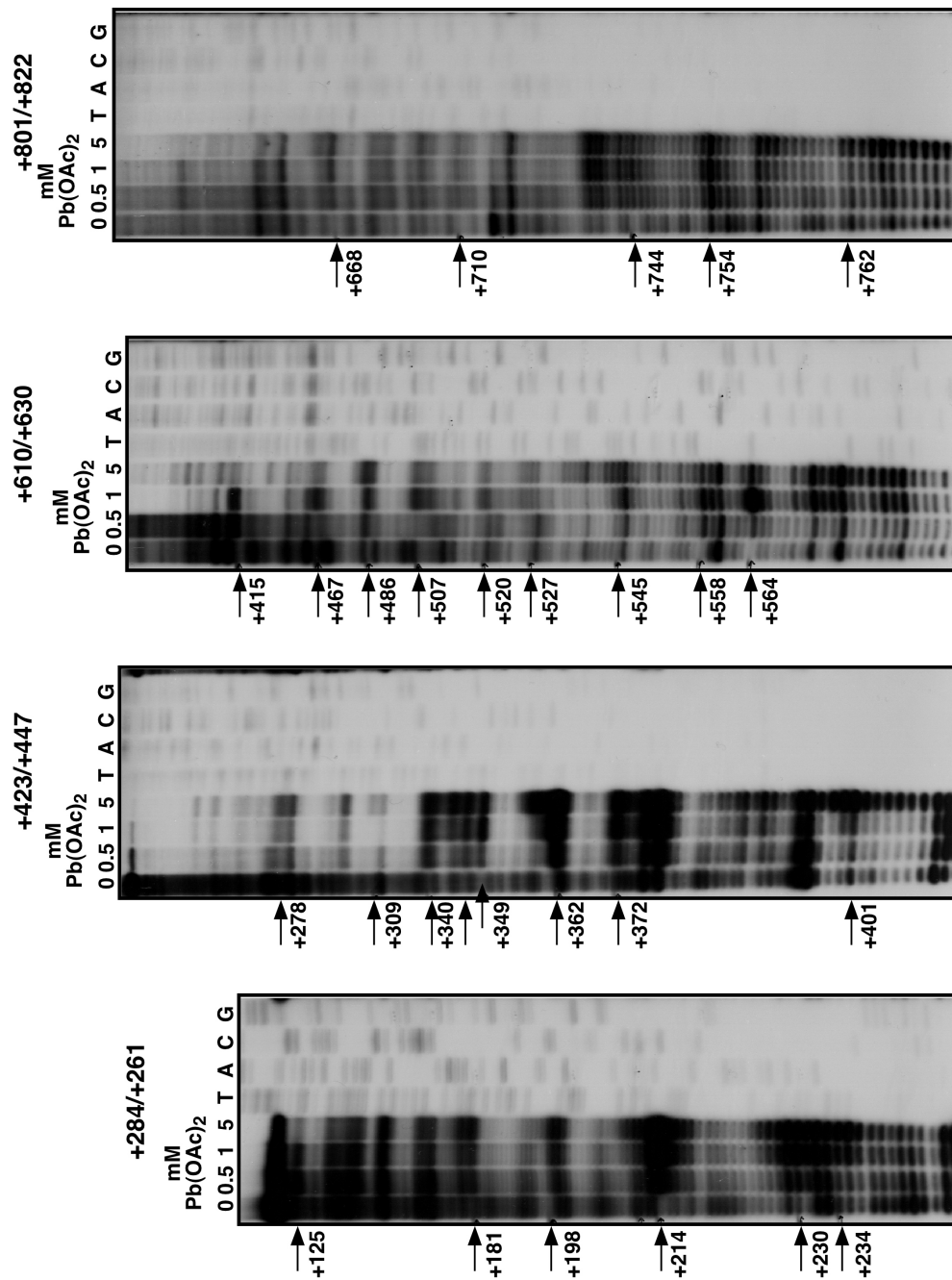


Abbildung 3.17: **Primer Extension der Pb^{2+} -Spaltfragmente des Transkripts (+115/+822).** Primer Extension Analyse mit den Primern (+261 \leftarrow +284), (+423 \leftarrow +447), (+610 \leftarrow +630) und (+801 \leftarrow +822). Die Zuordnung der Fragmente erfolgte mittels der Sequenzierung mit dem entsprechenden Primer. Die Pfeile kennzeichnen die Pb^{2+} -Spaltfragmente, die entsprechend Zurawski *et al.* [176] numeriert sind. Die Analyse erfolgte in einem 8%igem, denaturierenden Sequenziergel (1 \times TBE, 7 M Urea)

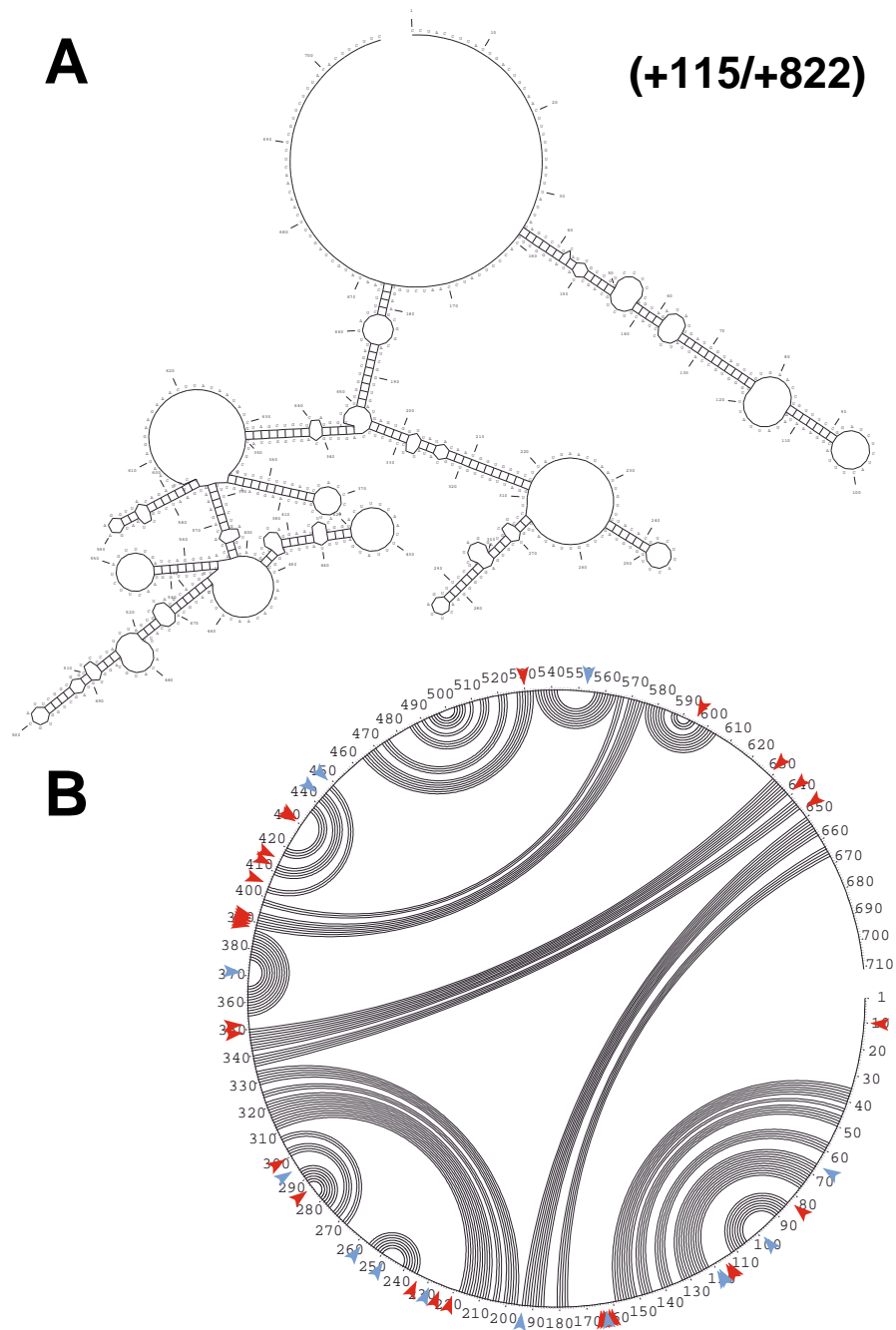


Abbildung 3.18: **Theoretische Struktur des 5'-seitig verkürzten Transkripts (+115/+822).** **A:** Die theoretische, thermodynamisch optimale Sekundärstruktur des Transkripts (+115/+822) ist hier zweidimensional als Helix-Loop-Darstellung gezeigt. **B:** Die theoretische, thermodynamisch optimale Sekundärstruktur als Kreis aufgespreitet. Die Basenpaarungen sind hier durch die Verbindungslinien zwischen zwei Basen dargestellt. Die roten Pfeile kennzeichnen alle bei dem Transkript (+115/+822) gefundenen Pb^{2+} -Spaltstellen; die blauen Pfeile kennzeichnen die Pb^{2+} -Spaltstellen, die bei allen untersuchten Transkripten gefunden wurden.

Abbildungen 3.12, 3.14, 3.16 und 3.18 durch blaue Pfeile markiert. Die RNA-Struktur an diesen Spaltstellen ist offensichtlich unabhängig von der Länge bzw. dem 5'-Ende des Transkripts, wie es von der theoretischen Sekundärstruktur auch vorhergesagt wird (Abb. 3.12, 3.14, 3.16 und 3.18).

An Position +26 liegt die Pb^{2+} -Spaltstelle in einem GAAA-Tetraloop. Sie ist in den Transkripten (-86/+822) und (-15/+822) zu detektieren. In Transkript (+18/+822) konnte diese Position nicht mehr detektiert werden. Das ist vermutlich auf die Lage des Tetraloops unmittelbar am 5'-Ende des Transkripts zurückzuführen. Position -5 wird in den beiden Transkripten, die diesen Sequenzbereich enthalten, (-86/+822) und (-15/+822), durch Pb^{2+} -Ionen gespalten. Über die Abhängigkeit der Spaltstelle von der Transkriptlänge und damit der Sekundärstruktur kann hier keine Aussage getroffen werden, da die Position für Transkript (-15/+822) in der theoretischen Struktur Bestandteil des verkürzten Strukturelements von Transkript (-86/+822) ist. Die Gegenstelle, die der Spaltstelle an Position -5 in dem Loop gegenüber liegt, ist Position +761. Diese Position befindet sich in allen Transkripten in Loopregionen und wird von Pb^{2+} -Ionen gespalten, wenn auch schwächer als in Transkript (-86/+822).

Pb^{2+} -Spaltstellen, die nur im längsten der untersuchten *in vitro* Transkripte nachgewiesen werden können bzw. ausschließlich in diesem nicht vorkommen, sollten Hinweise auf strukturelle Voraussetzungen liefern. Solche Pb^{2+} -Spaltstellen, die spezifisch für das Transkript (-86/+822) sind, finden sich an den Positionen +9, +342, +379, +572/+573 und +663 (grüne Pfeile in Abb. 3.12). Die Positionen sind gleichmäßig über die Sequenz verteilt und liegen bis auf Position +9, die nicht in allen Transkripten enthalten ist, in Bereichen, für die eine gleichbleibende Sekundärstruktur vorhergesagt wird. Auffällig ist jedoch, daß alle diese Spaltstellen in Nachbarschaft zu Positionen liegen, die in allen Transkripten gespalten werden.

Von größerer Bedeutung sind hier die Pb^{2+} -Spaltstellen, die nur in dem Transkript (-86/+822) **nicht** vorkommen: +33, +125, +340, +464, +499, +501, +510, +520, +526, +551 und +645 (gelbe Pfeile in Abb. 3.12). Diese nicht gespaltenen Positionen befinden sich fast alle in dem Bereich [+457(543) bis +761(847)], der ein Sekundärstrukturelement am 3'-Ende bildet, das laut der Strukturvorhersage nicht von der Verkürzung des 5'-Endes beeinflusst wird. Das Fehlen einiger Pb^{2+} -Spaltstellen in diesem Bereich bei Transkript (-86/+822), deutet jedoch darauf hin, daß hier in den verkürzten Transkripten Spaltstellen und/oder Bindestellen für zweiwertige Kationen zugänglich werden, die in längeren Transkripten durch die Ausbildung einer *long range* Wechselwirkung blockiert sind. Das könnte z. B. über eine durch die Verkürzung hervorgerufene Änderung der Tertiärstruktur vermittelt werden, da die postulierte *long range* Wechselwirkung die in ihrer Struktur gleichbleibenden Sequenzbereiche vermutlich in eine andere räumliche Anordnung bringt.

Bei der Pb^{2+} -Spaltung 5'-seitig verkürzter *in vitro* Transkripte konnten Pb^{2+} -Spaltstellen gefunden werden, die von der Transkriptlänge und damit von der Ausbildung der theoretisch vorhergesagten *long range* Wechselwirkung abhängen. Die Lage der Pb^{2+} -Spaltstellen läßt keinen direkten Schluß auf die Ausbildung der *long range* Wechsel-

wirkung zu, gibt aber indirekte Hinweise durch das spezifische Vorkommen bestimmter Spaltstellen in dem Transkript (-86/+822). Im weiteren sollte untersucht werden, inwieweit die Daten des 3'-seitig verkürzten Modelltranskripts (-86/+822) auf die Volllänge der *psbA* mRNA übertragen werden können. Um dabei möglichst dicht am biologischen System – und damit der natürlichen Faltung der mRNA – zu sein, wurde mit endogener RNA im intakten Organell gearbeitet.

3.4.3 Spezifische Hydrolyse der *psbA* mRNA mit Pb^{2+} -Ionen in organello

Bei der Analyse von *in vitro* Transkripten stellt sich immer die Frage, ob die *in vitro* Transkripte die gleiche Struktur ausbilden wie die entsprechende RNA *in vivo*. Die RNA-Faltung hängt *in vivo* von diversen Faktoren – wie den physiologischen Ionenbedingungen, der Synthesegeschwindigkeit und der Bindung von Proteinen – ab, die bei der *in vitro* Transkription nicht berücksichtigt werden können. So besteht immer die Möglichkeit, daß die Struktur des *in vitro* Transkripts nicht der Struktur der endogenen RNA entspricht. Um für die *psbA* mRNA zu untersuchen, inwieweit die Strukturdaten der Pb^{2+} -Spaltung von *in vitro* Transkripten mit der Struktur der endogenen mRNA korrelieren, wurde in Anlehnung an die von Lindell *et al.* beschriebene Pb^{2+} -Spaltung *in vivo* in *E. coli* [92] ein Protokoll für die spezifische Hydrolyse mit Pb^{2+} -Ionen *in organello* etabliert. Intakte Chloroplasten zeigen nach der Isolation noch mehrere Stunden normale physiologische Abläufe wie die Synthese bzw. die Degradation von RNAs und Proteinen; anders als lysierte Chloroplasten, in denen keine Synthese, aber eine verstärkte Degradation beobachtet werden kann. Intakte Chloroplasten sind daher ein zu *in vivo* Bedingungen vergleichbares, einfach zu handhabendes Modell für Untersuchungen an endogenen RNAs.

Für diese Untersuchungen wurden intakte Chloroplasten isoliert und in steigender Konzentration $Pb(OAc)_2$ inkubiert. Die Analyse der Pb^{2+} -Spaltstellen erfolgte anschließend mittels Primer Extension. Die verwendeten Oligonukleotide erlaubten eine Analyse von 1100 Nukleotiden, was nahezu der kompletten Sequenz entspricht. Der Bereich am 3'-Ende der mRNA konnte nicht abgedeckt werden, da die Primer für diesen Bereich die Sequenz des 3'-IR enthalten und damit stark selbstkomplementär sind. In Abb. 3.19 (Sequenzbereich -86 bis +500) und Abb. 3.20 (Sequenzbereich +500 bis +1089) sind die Autoradiographien der Primer Extension gezeigt. In den vier linken Spuren ist jeweils die Sequenzierung gezeigt, die zur Zuordnung der Signale benötigt wird. Diesen folgen fünf Spuren steigender Konzentration $Pb(OAc)_2$, die ohne Inkubation bei Raumtemperatur (0 Minuten) gestoppt wurden; daran anschließend jeweils immer fünf Spuren mit steigender Konzentration $Pb(OAc)_2$ nach 10, 15 bzw. 20 Minuten Inkubation gestoppt (für methodische Details siehe Kap. 2.3.5.2, S. 36).

Die Interpretation der Primer Extension Analyse der Pb^{2+} -Spaltung *in organello* ist schwieriger als bei Einsatz von *in vitro* Transkripten als Template. Der Hintergrund

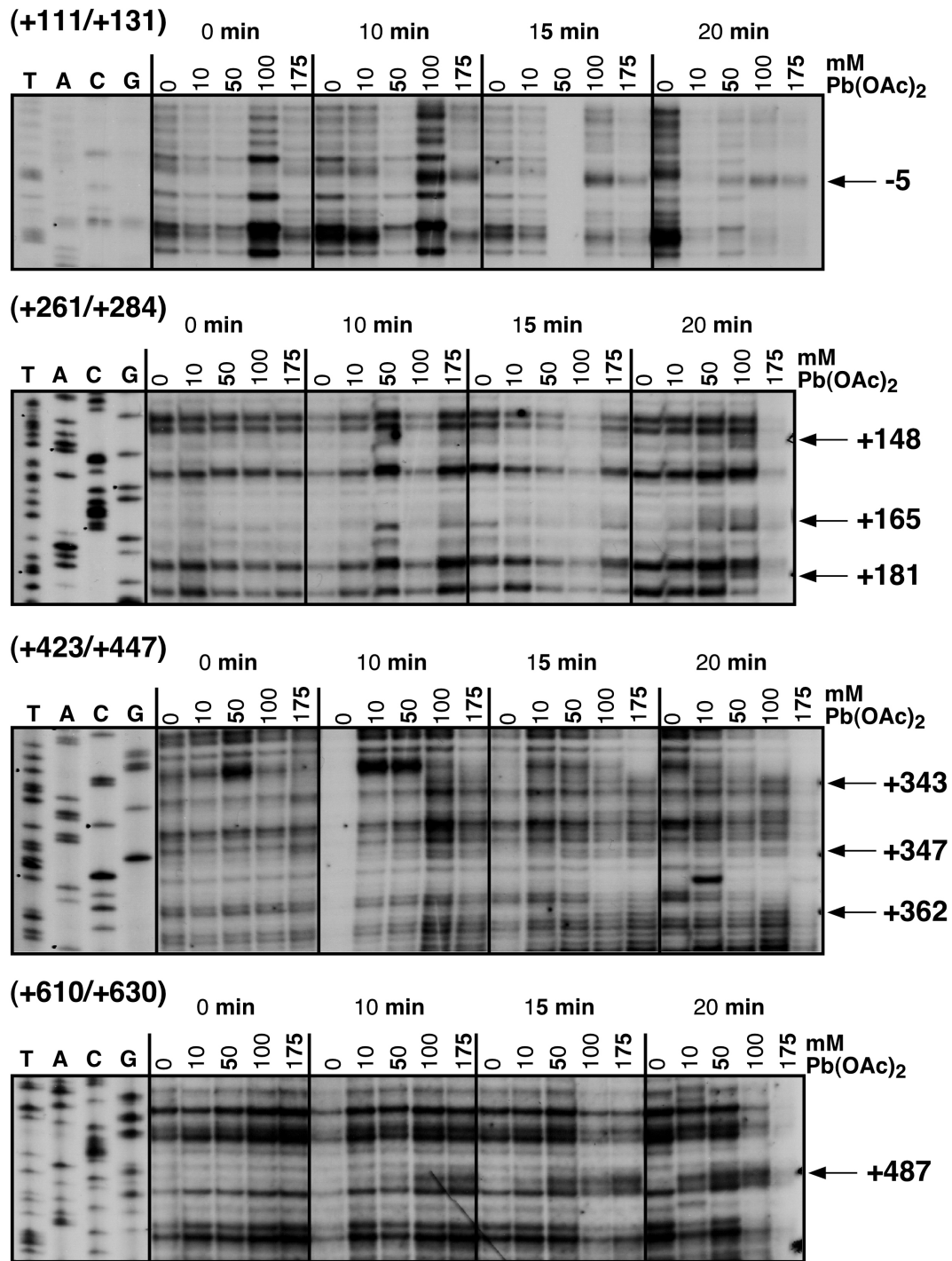


Abbildung 3.19: **Primer Extension Analyse der Pb^{2+} -Spaltung in organello.** Primer Extension Analyse der Pb^{2+} -Spaltung *in organello* mit den Primern (+111←+131), (+261←+284), (+423←+447) und (+610←+630) (lange Trennstrecke). Die Zuordnung der Fragmente erfolgte mittels der Sequenzierung mit dem entsprechenden Primer. Die Pfeile kennzeichnen die Pb^{2+} -Spaltfragmente, die entsprechend Zurawski *et al.* [176] nummeriert sind. Die Analyse erfolgte in einem 8%igem, denaturierenden Sequenziergel (1×TBE, 7 M Urea).

3.4 Analyse der *psbA* mRNA durch spezifische Hydrolyse mit Pb^{2+} -Ionen

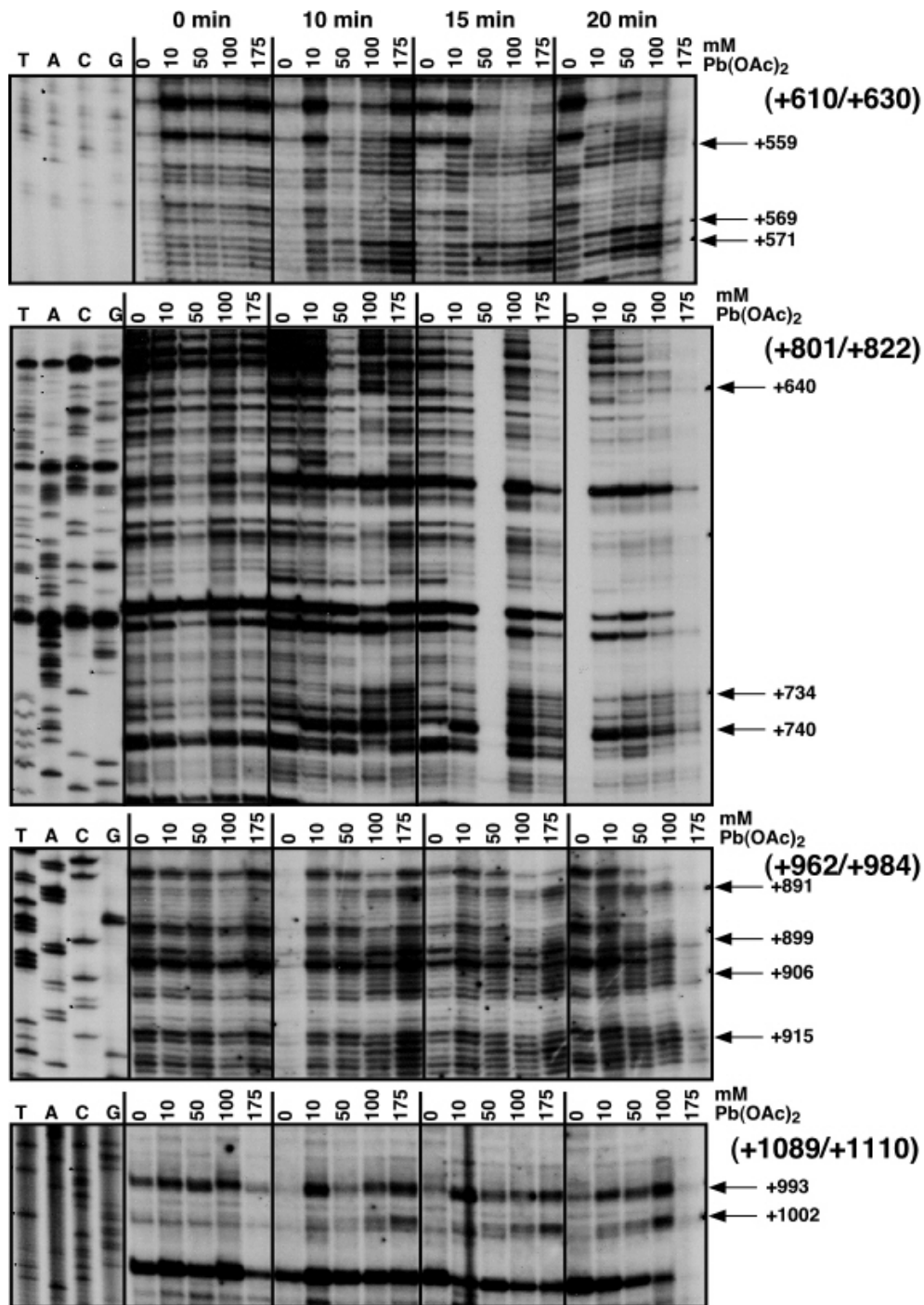


Abbildung 3.20: **Primer Extension Analyse der Pb^{2+} -Spaltung in organello.** Primer Extension Analyse der Pb^{2+} -Spaltung *in organello* mit den Primern (+610←+630) (kurze Trennstrecke), (+801←+822), (+964←+982) und (+1089←+1110). Die Zuordnung der Fragmente erfolgte mittels der Sequenzierung mit dem entsprechenden Primer. Die Pfeile kennzeichnen die Pb^{2+} -Spaltfragmente, die entsprechend Zurawski *et al.* [176] nummeriert sind. Die Analyse erfolgte in einem 8%igem, denaturierenden Sequenziergel (1×TBE, 7 M Urea).

an RNA-Fragmenten ist wesentlich stärker, was vor allem auf methodische Probleme zurückzuführen ist: in isolierten Chloroplasten degradiert die RNA im Vergleich zu *in vitro* Transkripten, bei denen so gut wie keine Degradation beobachtet werden kann. Insbesondere wenn die Organellen bei Raumtemperatur inkubiert werden, findet der RNA-Abbau als normaler physiologischer Vorgang statt. Auf diesem Prinzip basiert das *in vitro* Degradationssystem, das für die Untersuchung des mRNA-Abbaus in Chloroplasten benutzt wird [75]. Ein weiteres Problem, das zu einer Verstärkung des Hintergrunds führt, ist die Aufreinigung der RNA aus den Chloroplasten. Bei dieser Prozedur kann es zu Strangbrüchen in der RNA kommen, so daß hierbei neben den intakten Molekülen auch diverse Fragmente in der aufgereinigten RNA vorhanden sind. Für die Primer Extension Analyse bedeutet das, daß nicht nur die Spaltprodukte der Hydrolyse durch Pb^{2+} -Ionen, sondern auch die Produkte des regulären RNA-Abbaus detektiert werden.

Mit Hilfe der durchgeführten Kontrollen war es möglich durch Pb^{2+} -Ionen induzierte Fragmente *in organello* nachzuweisen. Und zwar wird die *psbA* mRNA an den Positionen -5, +148, +165, +181, +345, +347, +362, +488, +558, +570, +572, +640, +734, +740, +891, +899, +906, +915, +993 und +1002 durch Pb^{2+} -Ionen gespalten. Die spezifischen Pb^{2+} -Spaltstellen unterscheiden sich von den Produkten des RNA-Abbaus durch ihr Fehlen in den Kontrollen ohne $\text{Pb}(\text{OAc})_2$ bzw. 0 Minuten Inkubation. Produkte des RNA-Abbaus können dagegen in allen Spuren detektiert werden. Die Daten sind in Abb. 3.21 in die theoretische, thermodynamisch optimale Sekundärstruktur eingetragen. Diese Positionen liegen alle in einzelsträngigen Bereichen der theoretischen Struktur, was mit der Einzelstrangspezifität der Hydrolyse durch Pb^{2+} -Ionen korreliert. In Tabelle 3.2 sind die Spaltstellen im Vergleich mit ihrem Vorkommen in *in vitro* Transkripten aufgelistet (siehe auch Tab. 3.1, S. 60). Nicht alle Spaltstellen *in organello* haben eine korrespondierende Spaltstelle in *in vitro* Transkripten und umgekehrt. Generell konnten auf der *psbA* mRNA *in organello* deutlich weniger Pb^{2+} -Spaltstellen identifiziert werden als bei *in vitro* Transkripten. Das mag zum einen auf den hohen Hintergrund bei der Pb^{2+} -Spaltung *in organello* zurückzuführen sein. Dadurch liegen möglicherweise einige Spaltstellen an der gleichen Position wie Sollbruchstellen oder endonukleolytische Schnittstellen des Abbaus und können daher nicht detektiert werden. Zum anderen ist die endogene RNA mit Proteinen assoziiert, was die Bindung von bzw. Spaltung durch Pb^{2+} -Ionen an einigen Stellen unterdrücken könnte. Weiterhin kann nicht sicher gestellt werden, daß die RNA-Konzentration *in organello* gleich hoch ist, wie bei der Hydrolyse von *in vitro* Transkripten. Ist die RNA-Konzentration *in organello* höher, würde dadurch die Spaltungseffizienz einer einzelnen mRNA-Population sinken. Auch unterscheiden sich die Ionenzusammensetzungen bei der Spaltung *in vitro* und *in organello* deutlich. Während bei der Spaltung von *in vitro* Transkripten keine anderen zweiwertigen Kationen zugesetzt sind, gibt es im Chloroplasten diverse, von denen wenigstens Mg^{2+} -Ionen auch in millimolaren Konzentrationen vorkommen und damit eine starke Konkurrenz für die zugesetzten Pb^{2+} -Ionen darstellen.

Für die *in organello* Spaltstellen an Positionen $>(+765)$ gibt keine entsprechenden Stellen, da für die Experimente mit *in vitro* Transkripten als Basis das Transkript

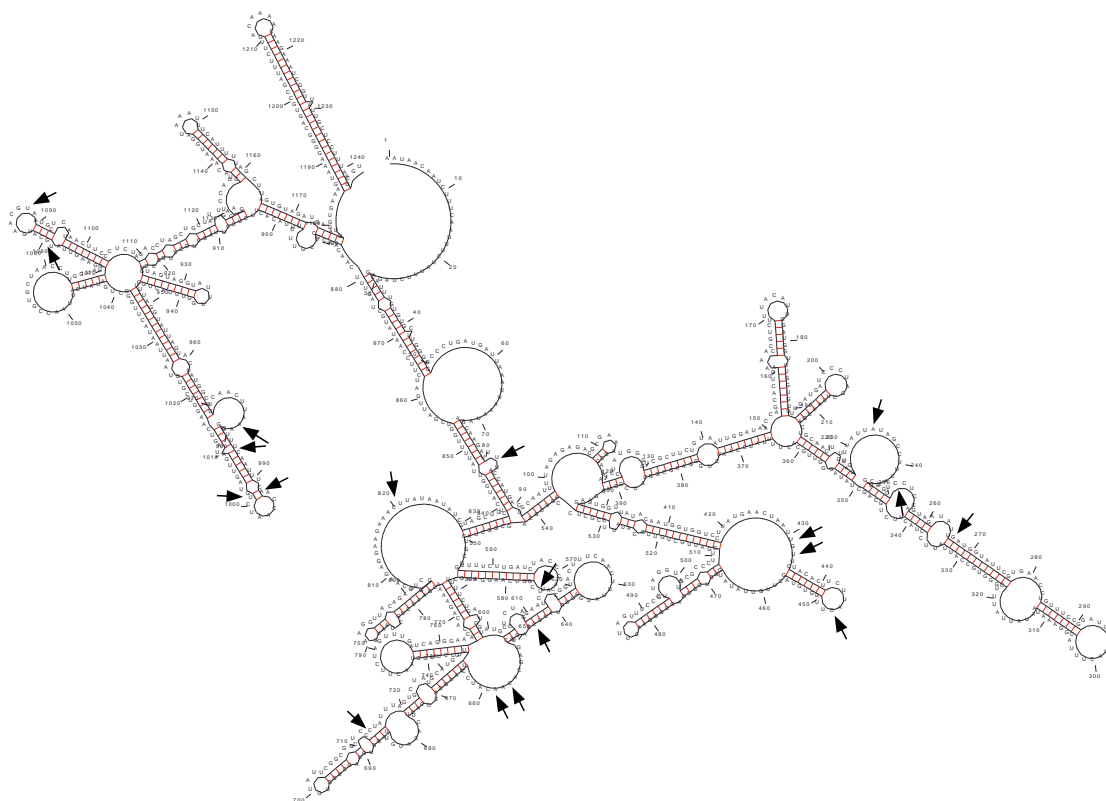


Abbildung 3.21: **Theoretische Struktur der *psbA* mRNA.** Die theoretische, thermodynamisch optimale Sekundärstruktur der *psbA* mRNA ist hier zweidimensional als Helix-Loop-Darstellung gezeigt. Die Pfeile kennzeichnen die bei der *in organello* Pb^{2+} -Spaltung gefundenen Spaltstellen.

(-86/+822) verwendet wurde, denen das 3'-Ende der Vollängensequenz fehlt. Bei den Positionen $<(+765)$ haben acht der vierzehn Pb^{2+} -Spaltstellen eine korrespondierende Spaltstelle in den *in vitro* Transkripten (-5, +181, +345, +362, +488, +558, +572 und +640). Dabei kommen die korrespondierenden Spaltstellen entweder in allen *in vitro* Transkripten (+181, +345, +362, +488 und +558) oder in den beiden längsten Transkripten (-86/+822) und (-15/+822) – vor (-5 und +640). Eine Spaltstelle – +572 – hat nur in Transkript (-86/+822) eine korrespondierende Spaltstelle, die in keinem der 5'-verkürzten Transkripte nachgewiesen werden konnte. Das bedeutet, es gibt Pb^{2+} -Spaltstellen, die unabhängig von einer Verkürzung des 5'-Endes sind und dementsprechend in allen *in vitro* Transkripten und in der endogenen RNA vorkommen. Diese Pb^{2+} -Spaltstellen (+181, +345, +362, +488 und +558) liegen alle in Sequenzabschnitten, deren Sekundärstruktur *in silico* nicht durch eine Verkürzung verändert wird.

Andererseits gibt es Pb^{2+} -Spaltstellen, deren Vorkommen direkt mit der Verkürzung zusammenhängt (-5, +572 und +640). Bei diesen Spaltstellen scheint – nach der theoretischen Sekundärstruktur – die Ausbildung von Basenpaaren zwischen 5'- und 3'-Ende von Bedeutung zu sein (Vergleiche dazu Abb. 3.14, S. 65 und Abb. 3.16, S. 67). Die Positionen +572 und +640 liegen zwar in einem Sequenzabschnitt, dessen theoretische Sekundärstruktur sich durch Verkürzung am 5'-Ende nicht ändert, aber hier ist es durchaus denkbar, daß eine veränderte Tertiärstruktur, die theoretisch nicht erfaßt werden kann, das Fehlen dieser Spaltstellen in verkürzten Transkripten bedingt. In diesem Sequenzbereich [+457(543) bis +761(847)] finden sich bei den verkürzten Transkripten auch mehrere Positionen, die in Transkript (-86/+822) – wie auch *in organello* – nicht gespalten werden.

Die Spaltung der *psbA* mRNA an Position -5 ist durch die 5'-seitig verkürzten *in vitro* Transkripte nur bedingt mit der Ausbildung einer *long range* Wechselwirkung zu korre-

Tabelle 3.2: **Pb^{2+} -Spaltstellen der *psbA* mRNA in organello.** In der linken Spalte sind die *in organello* gefundenen Pb^{2+} -Spaltstellen aufgelistet. In der rechten Spalte ist – soweit bekannt – ihr Vorkommen in *in vitro* Transkripten angegeben (siehe dazu auch Tab. 3.1, S. 60).

Position	Signal bei 5'-verkürzten Tanskripten
-5	(-86/+822), (-15/+822)
+148	-
+165	-
+181	alle
+345	alle
+347	-
+362	alle
+488	alle
+558	alle
+570	-
+572	(-86/+822)
+640	(-86/+822), (-15/+822)
+734	-
+740	-
+891	
+899	
+906	
+915	
+993	
+1002	

lieren, da die Transkripte (+18/+822) und (+115/+822) zwar die *long range* Wechselwirkung nicht in ihrer theoretischen Struktur enthalten, aber die Position -5 überhaupt nicht Bestandteil ihrer Sequenz ist. Frühere Experimente mit 3'-seitig verkürzten Transkripten unterstützen allerdings die Abhängigkeit der Pb^{2+} -Spaltung an Position -5 von der Ausbildung von Basenpaaren zwischen 5'- und 3'-Ende der mRNA [143]. Die Daten der spezifischen Hydrolyse mit Pb^{2+} -Ionen *in vitro* und *in organello* unterstützen – wie auch die Daten der UV-Quervernetzungsexperimente (siehe Kap. 3.3, S. 55) – die Annahme, daß die *psbA* mRNA *in vitro* wie auch *in organello* eine *long range* Wechselwirkung zwischen 5'- und 3'-Ende in ihrer Sekundärstruktur ausbildet.

3.5 Minimalkonstrukt eines long range Strukturelements der *psbA* mRNA

3.5.1 Design des Minimalkonstrukts

Die UV-Verknüpfungsexperimente (siehe Kap. 3.3, S. 55) postulieren eine *long range* Wechselwirkung in der Sekundärstruktur der *psbA* mRNA, wie sie auch *in silico* als thermodynamisch optimal vorhergesagt wird (siehe als Beispiel Abb. 3.21). Dieses *long range* Strukturelement wird auch durch Experimente mit spezifischer Hydrolyse durch Pb^{2+} -Ionen 5'-seitig verkürzter *in vitro* Transkripte (Kap. 3.4.2) und *in organello* (Kap. 3.4.3) bestätigt. Um zu zeigen, daß die *psbA* mRNA tatsächlich das *in silico* vorhergesagte Strukturelement enthält, wurde ein Minimalkonstrukt des betreffenden Strukturelements entworfen, das die Sekundärstruktur der *long range* Wechselwirkung stabil ausbildet. Sollten biochemische Strukturanalysen vergleichbare Daten für das Minimalkonstrukt und das Vollängetranskript zeigen, wäre dies ein Hinweis darauf, daß die *psbA* mRNA dieses für mRNAs eher untypische *long range* Strukturelement tatsächlich ausbildet.

Dem Design des Minimalkonstrukts wurden theoretisch vorhergesagte Sekundärstrukturen unterschiedlich langer Bereiche der *psbA* mRNA zugrunde gelegt. Die Strukturvorhersage erfolgte mit dem Programm **LinAll**, das – basierend auf einem Energieminimierungsalgorithmus – die thermodynamisch optimale Sekundärstruktur einer Sequenz errechnet [138, 149].

In Abb. 3.22 sind die themodynamisch optimalen Strukturen der Sequenzbereiche (-86/+447) und (-86/+822) dargestellt. In früheren Experimenten mit spezifischer Hydrolyse durch Pb^{2+} -Ionen der entsprechenden *in vitro* Transkripte konnte gezeigt werden, daß die prominente Spaltstelle an Position -5(81) verschwindet, wenn das Transkript so stark verkürzt wird, daß es die langen Helices zwischen 5'- und 3'-Ende nicht mehr ausbilden kann (schwarz gefärbt). Die sequenzidentischen Bereiche beider Transkripte sind in der Abb. 3.22 farblich hervorgehoben. Der lila gefärbte Bereich [+457(543) bis +761(847)] und die weiter 3'-gelegenen Sequenzen von (-86/+822) fehlen bei (-86/+447). Dies führt bei (-86/+447) zu einer anderen Sekundärstruktur des 5'-Endes, das in (-86/+822) mit dem 3'-Ende umfassend Basenpaare ausbildet. Der grün gefärbte Sequenzbereich [+310(396) bis +448(534)] ist in beiden Sekundärstrukturen gleich und der blau gefärbte [+35(121) bis +306(392)] nur leicht verändert, was vermutlich auch auf die veränderte Sekundärstruktur am 5'-Ende zurückzuführen ist.

Als Minimalkonstrukt wurde die helikale Sekundärstruktur, die 5'- und 3'-Ende von der Volllänge bis zu (-86/+822) ausbilden können, gewählt (Abb. 3.23 A; rot hervorgehoben: [-86(1) bis +34(120)] sowie [+753(839) bis +822(908)]). Der Loopbereich um +34(120) wurde soweit möglich entsprechend der Ausgangssequenz ergänzt und als Loop vergleichbarer Größe erhalten. Der Verzweigungsloop, der bei +456(542) beginnt, wurde geschlossen, um die Sekundärstruktur zu stabilisieren. Weiterhin wurden die Sequenzbereiche [+35(121) bis +306(392)] (Abb. 3.22 blau), [+310(396) bis +448(534)]

3.5 Minimalkonstrukt eines long range Strukturelements der psbA mRNA

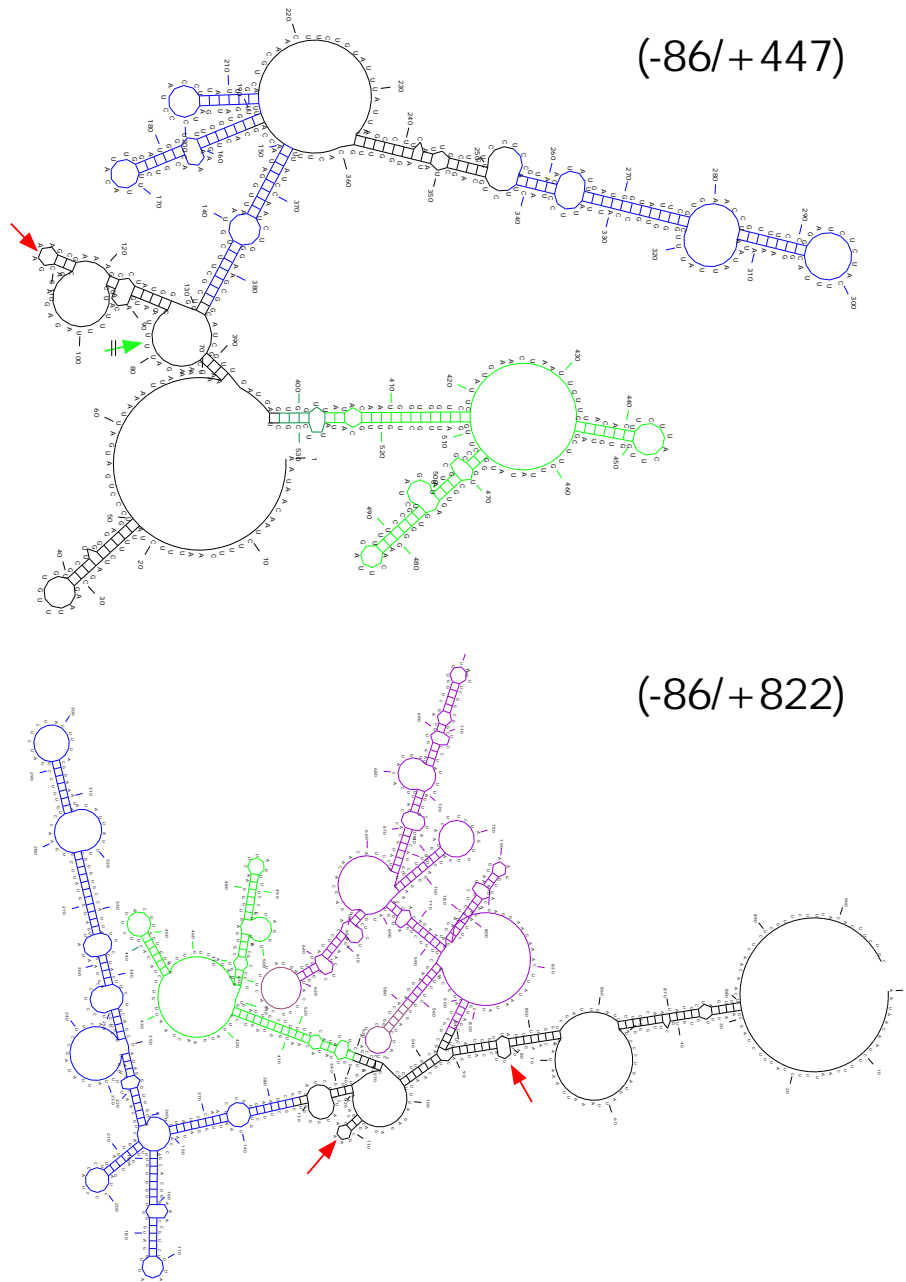


Abbildung 3.22: **Vergleich der theoretischen Sekundärstruktur der in vitro Transkripte (-86/+447) und (-86/+822).** **A:** Die theoretische Sekundärstruktur von (-86/+447). **B:** Die theoretische Sekundärstruktur von (-86/+822). Farblich hervorgehoben sind die jeweils identischen Sequenzbereiche in beiden Strukturen. Die Pfeile markieren die bekannten Mg^{2+} -abhängigen Pb^{2+} -Spaltstellen an den Positionen -5(81) und +27(113) sowie ihr Auftreten beim jeweiligen Transkript.

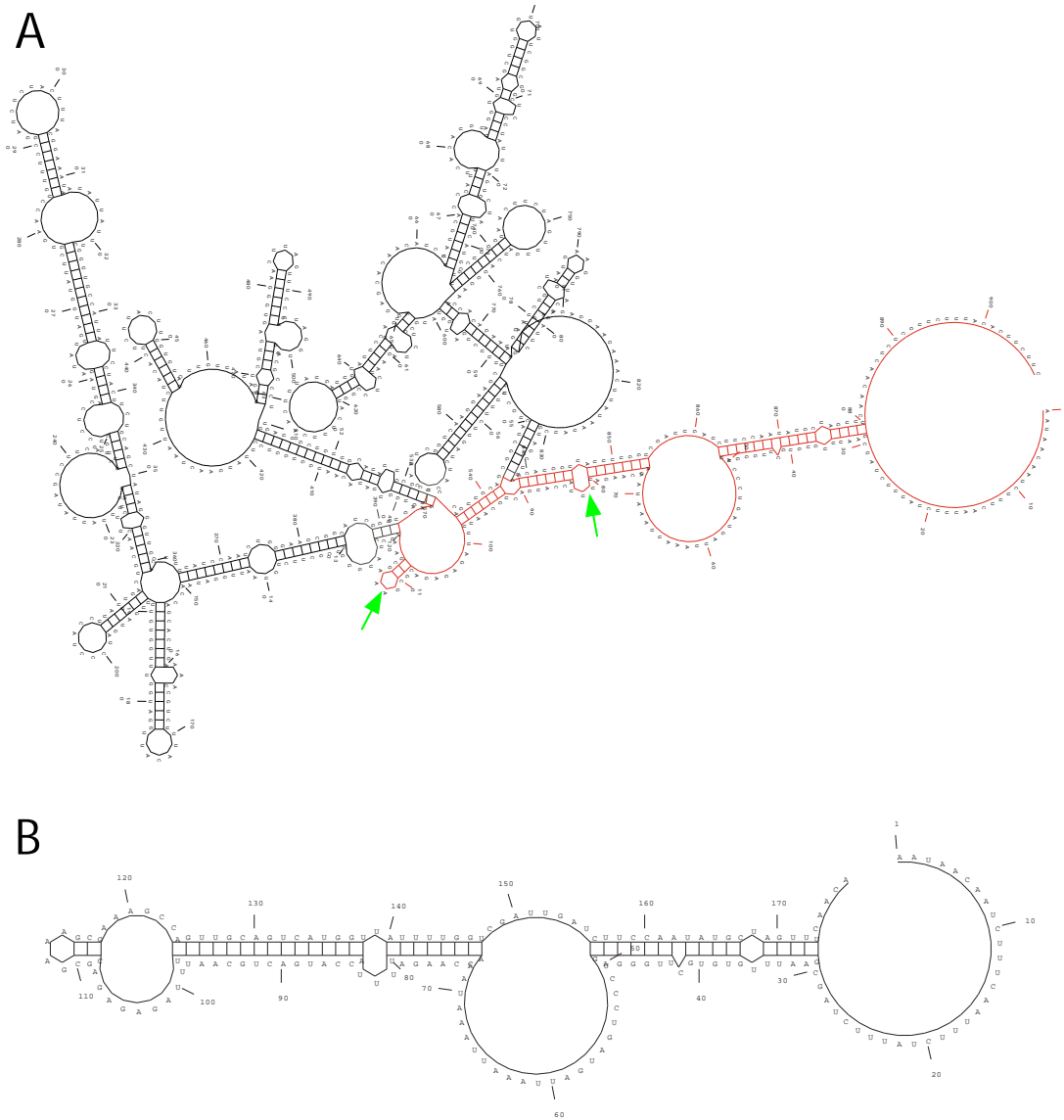


Abbildung 3.23: **Struktur/Sequenz des Minimalkonstruktes in der Struktur/Sequenz von (-86/+822).** **A:** Die theoretische Sekundärstruktur des *in vitro* Transkripts (-86/+822), in der die Sequenz des Minimalkonstrukts rot hervorgehoben ist. Die Pfeile markieren bereits bekannte Mg^{2+} -abhängige Pb^{2+} -Spaltstellen [143]. **B:** Die theoretische Sekundärstruktur des Minimalkonstrukts.

(Abb. 3.22 grün) und [+457(543) bis +761(847)] (Abb. 3.22 lila) abgeschnitten. Der Tetraloop [+22(108) bis +31(117)] ist Teil der Originalsequenz. Er sorgt für die korrekte Ausbildung der Sekundärstruktur.

Da dieses Konstrukt von Sequenzbereichen ausgebildet wird, die in der Primärsequenz mehrere hundert Nukleotide auseinanderliegen, mußten die entsprechenden Sequenzen zunächst auf einem DNA-Strang kombiniert werden, um davon *in vitro* Transkripte der entsprechenden Sequenz und Struktur herstellen zu können. Dies wurde durch Ligatation zweier Oligonukleotide, die zusammen der geplanten Sequenz entsprechen, realisiert (für Details siehe Kap. 2.2.3, S. 29). In Abb. 3.23 B ist die Sekundärstruktur des Minimalkonstrukts dargestellt; die Sequenzen des Minimalkonstrukts und der verwendeten Oligonukleotide finden sich in Anhang A.3.

3.5.2 Thermodynamische Analyse des Minimalkonstrukts

3.5.2.1 TGGE-Analyse des Minimalkonstrukts

Die TGGE-Analyse ermöglicht die Untersuchung der Konformationen bzw. der Strukturverteilung im thermodynamischen Gleichgewicht von RNAs anhand ihres Denaturierungsverhaltens im PAA-Gel. Als Meßgröße dient hier die Mobilitätsänderung eines RNA-Moleküls entsprechend seinem Denaturierungsgrad. Die Mobilitätsänderung ist – im Gegensatz zur Hypochromie, die bei den optischen Denaturierungskurven gemessen wird – eine indirekte Meßgröße, da nicht jede Öffnung eines Basenpaares oder Umlagerung der Struktur einen sichtbaren Effekt in der Mobilität des Moleküls zeigt. In Abb 3.24 ist die Analyse des Minimalkonstrukts mittels TGGE gezeigt.

Um Effekte von Mg^{2+} -Ionen auf das *in vitro* Transkript des Minimalkonstrukts zu untersuchen, wurde das Transkript zunächst denaturiert und rasch auf Eis abgekühlt („snap cooling“). Anschließend wurde das Minimalkonstrukt in drei überlappenden Temperaturbereichen, die insgesamt 5–90 °C umfaßten, unter verschiedenen Ionenbedingungen analysiert. In der Abbildung stehen jeweils die TGGEs der drei überlappenden Temperaturbereiche für eine Salzbedingung nebeneinander. Untereinander befinden sich jeweils die TGGEs eines Temperaturbereichs für die verschiedenen Salzbedingungen. Die oberste Reihe zeigt das Verhalten der Minimalkonstrukt-RNA ohne Zusatz von Salzen. Das Minimalkonstrukt zeigt im kalten Temperaturbereich (5–35 °C) einen breiten Übergang, der mit einer Verzögerung der RNA einhergeht (Pfeil H), die bei ungefähr 20 °C ihr Maximum hat. Unter der Hauptbande sind mehrere Nebenbanden zu erkennen (siehe Pfeile N). Im mittleren Temperaturbereich (20–60 °C) zeigt die RNA ein komplexes Laufverhalten. Bei 20 °C erkennt man – wie schon im kalten Temperaturbereich – mehrere nebeneinander vorliegende Konformationen (H und N). Ab ca. 30 °C zeigt sich eine deutliche Beschleunigung der Hauptbande (H). Dieses Laufverhalten ist für einen Übergang eher untypisch, da normalerweise bei der Denaturierung zunächst eine sperrigere Struktur entsteht, die verzögert wird. Hier entsteht offensichtlich direkt eine Struktur, die eine sehr viel höhere Mobilität als die ursprüngliche Struktur hat. Die koexistie-

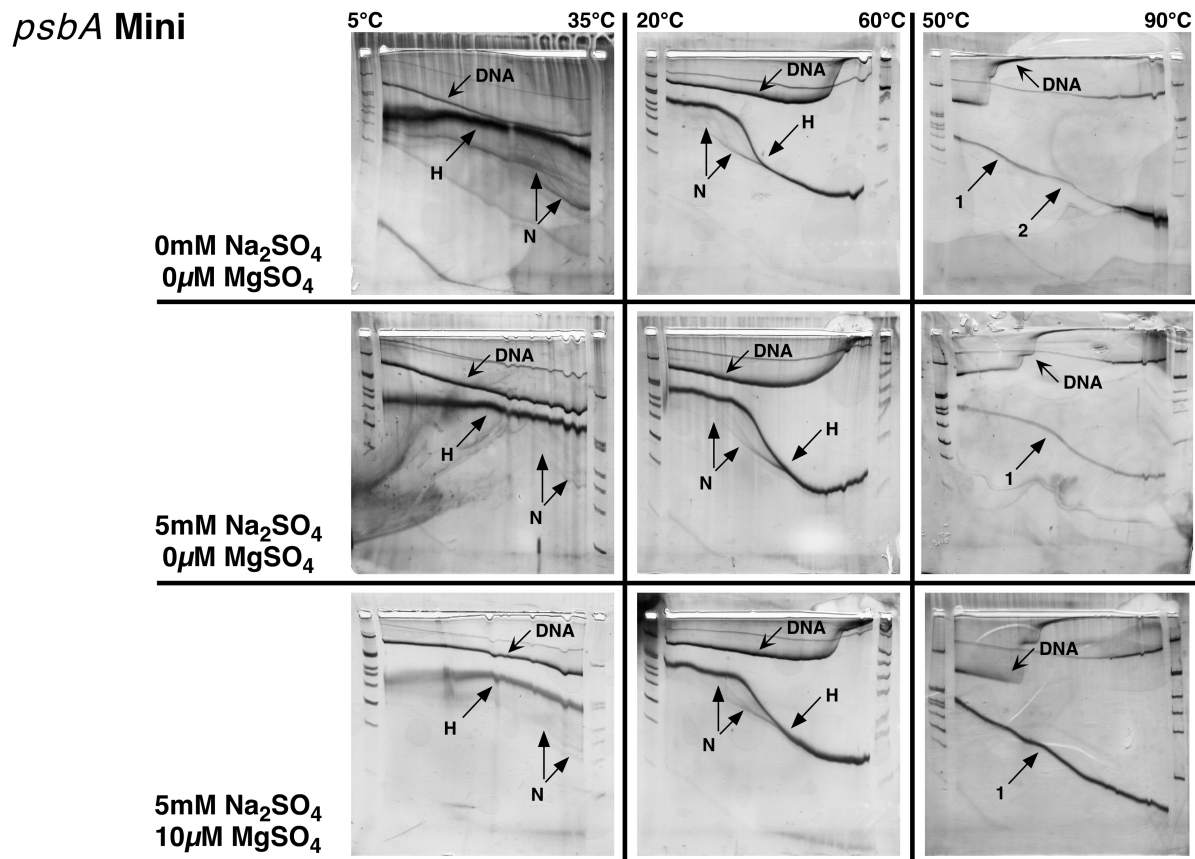


Abbildung 3.24: **TGGEs des Minimalkonstrukts.** Das *in vitro* Transkript des Minimalkonstrukts wurde in TGGEs mit 8% PAA (Vernetzungsgrad 30:0,8), 0,2×TB, 5 mM Na₂SO₄ und 0 bzw. 10 µM MgSO₄ analysiert. Als Kontrolle enthielt die Probe 100 ng PCR-Produkt von (-86/+822), die durch einen Pfeil und „DNA“ gekennzeichnet ist. Es wurden drei überlappende Temperaturbereiche gewählt: 5–35°C, 20–60°C und 20–60°C mit 8 M Urea (entspricht: ca. 50–90°C). Der Nachweis erfolgte über Silberfärbung.

renden Strukturen gehen bei ca. 45°C in die Hauptbande über. Das bedeutet, daß es sich nicht um eine Verunreinigung mit kürzeren Transkriptfragmenten handelt, sondern es tatsächlich alternative Konformationen des Minimalkonstrukts sind. Außerdem läßt dieses Laufverhalten im mittleren Temperaturbereich darauf schließen, daß das Transkript in diesem Bereich mindestens in zwei Übergängen, die hier nicht aufgelöst werden konnten, nahezu vollständig denaturiert. Dies wird auch vom Laufverhalten im heißen Temperaturbereich (20–60°C mit 8 M Urea entspricht ca. 50–90°C) unterstützt. Hier zeigt das Minimalkonstrukt bis auf zwei schwach ausgeprägte Übergänge bei ca. 60°C (1) und 80°C (2) nur noch die allgemeine Beschleunigung, die alle Nukleinsäuren bei zunehmender Temperatur in der Gelmatrix erfahren. Diese Beschleunigung wird auf eine Veränderung der Fluidität der Gelmatrix mit steigender Temperatur zurückgeführt.

Bei einer Ionenstärke von 10 mM Na⁺-Ionen (mittlere TGGE-Reihe) zeigen sich im

kalten und mittleren Temperaturbereich – außer einer Verschiebung der Übergänge um etwa 5 °C zu höheren Temperaturen entsprechend der Erhöhung der Ionenstärke – keine Veränderungen des Laufverhaltens. Auch hier liegt das Minimalkonstrukt in mehreren koexistierenden Konformationen vor (N), die bei 45→50 °C in die Hauptbande übergehen. Im heißen Temperaturbereich ist unter diesen Salzbedingungen der Übergang bei ca. 60→70 °C (1) stärker ausgeprägt und der bei 80 °C (2) liegt außerhalb bzw. am Rand (90 °C) des betrachteten Temperaturfensters.

Fügt man zusätzlich zu 10 mM Na⁺-Ionen noch 10 µM Mg²⁺-Ionen hinzu (untere TGGE-Reihe), sieht man im kalten und mittleren Temperaturbereich keinerlei Veränderung und keine weitere Stabilisierung. Auch hier findet man die koexistierenden Konformationen (H und N). Im heißen Temperaturbereich fällt auf, daß der Übergang bei ca. 70 °C (1), der bei 10 mM Na⁺-Ionen stark ausgeprägt ist, fast nicht mehr zu erkennen ist. Das Laufverhalten ähnelt dem ohne zugesetzte Salze (obere Reihe).

Die TGGE-Analyse zeigt ein charakteristisches Laufverhalten des Minimalkonstrukts in Abhängigkeit von seinem Denaturierungsgrad. Allerdings konnten die Strukturübergänge nicht eindeutig Temperaturen zugeordnet werden, da sie zu schwach ausgeprägt oder zu breit waren, und der Hauptübergangsbereich scheint nicht vollständig aufgelöst zu sein. Dies wurde im weiteren näher mit optischen Denaturierungskurven untersucht.

3.5.2.2 Optische Denaturierungskurve des Minimalkonstrukts

Um die Daten aus der TGGE-Analyse zu spezifizieren, wurden mit dem Minimalkonstrukt optische Denaturierungskurven unter den bereits in der TGGE verwendeten Salzbedingungen aufgenommen. Insbesondere sollte der Hauptübergang ab ca. 30 °C, bei dem die TGGE-Analyse auf mehrere nicht aufgelöste Übergänge schließen ließ, und die Veränderung des Übergangs bei ca. 60 °C in Abhängigkeit von Mg²⁺ näher untersucht werden.

Es wurden dialysierte Proben verwendet, die – wie bei der TGGE-Analyse – durch „snap cooling“ vorbehandelt wurden. Beim „snap cooling“ werden durch das rasche Abkühlen nach der Denaturierung Strukturen, die sich schnell ausbilden, aber nicht unbedingt thermodynamisch optimal sein müssen, begünstigt. Man spricht daher von einer kinetischen Struktureinstellung im Gegensatz zur thermodynamischen Struktureinstellung durch „slow cooling“ (langsames Abkühlen nach Denaturierung). Bereits in Vorversuchen zur TGGE-Analyse konnte kein Effekt durch unterschiedliche Struktureinstellung gezeigt werden. Da bei der optischen Denaturierungskurve mit jeder Probe mehrere Schmelzkurven aufgenommen wurden, war die Probe nach dem ersten Durchgang thermodynamisch eingestellt (Abkühlungsrate bei der Schmelzkurve 1 °C pro Minute). Alle Kurven hatten reproduzierbar den gleichen Verlauf, so daß man davon ausgehen kann, daß es für das Minimalkonstrukt keine kinetisch favorisierten Strukturen gibt.

In Abb. 3.25 ist eine optische Schmelzkurve des Minimalkonstrukts gezeigt. Die Ionenstärke war mit 10 mM NaCl, 1 mM Nacacodylat und 0.1 mM EDTA der TGGE-Analyse mit 5 mM Na₂SO₄ vergleichbar. Die Daten wurden mit dem Programm **Sigma**

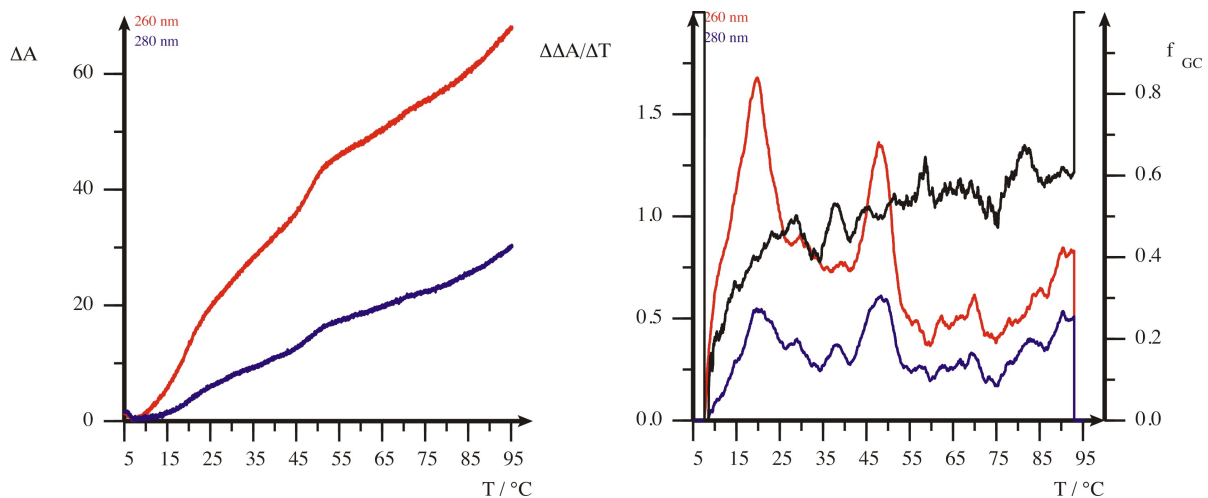


Abbildung 3.25: **Optische Schmelzkurve des Minimalkonstrukts.** Die optische Schmelzkurve des Minimalkonstrukts in integrierter (links) und differenzierter (rechts) Form. Bedingungen: 10 mM NaCl, 1 mM Nacacodylat, 0.1 mM EDTA. Temperaturbereich: 5–95 °C. Heizrate: 1 °C/Minute

in integrierter (ΔA gegen T) und differenzierter Form ($\Delta\Delta A/\Delta T$ gegen T) ausgegeben. Die differenzierte Form der Schmelzkurve läßt drei Übergänge (Maxima) bei 20 °C, 47 °C und 70 °C erkennen, die sehr gut mit den Übergängen korrespondieren, die in der TGGE-Analyse bestimmt wurden. Dabei entspricht der Übergang bei 47 °C dem Bereich in der TGGE, in dem die koexistierenden Strukturen in die Hauptbande übergehen. Am Kurvenverlauf fällt auf, daß die Absorption zwischen den Übergängen bei 20 °C und 47 °C weiter zunimmt, was in der differenzierten Form dazu führt, daß die Werte auf hohem Niveau bleiben, aber nicht als zusätzlicher Übergang (Maximum) zu erkennen sind. Außerdem ist der Übergang bei 70 °C ungewöhnlich. Bei einem Strukturelement, das so stabil ist, daß es erst bei 70 °C denaturiert, würde man einen steileren Übergang mit geringer Breite erwarten, an dem also mehr Basenpaare beteiligt sind. Hier scheint es sich dagegen um ein kleines Strukturelement mit wenigen Basenpaaren zu handeln, das erst bei 70 °C denaturiert.

Im weiteren wurden die differenzierten Daten der optischen Schmelzkurve mittels einer Optimierung nach van't Hoff mit dem Programm **Meltfit** ausgewertet. Das Programm **Meltfit** paßt eine oder mehrere van't Hoff Gleichungen an die differenzierte Form der Schmelzkurve durch Optimierung von ΔA , ΔH^0 , ΔS^0 und des T_M -Wertes an. Die Auswertung zeigte, daß das Programm **Meltfit** bei der Näherung einen 4. Übergang bei 34 °C postulierte. Die anderen Übergänge deckten sich mit denen aus der differenzierten Form der Schmelzkurve. Der Übergang bei 34 °C liegt in dem Bereich des Hauptübergangs der TGGEs, wo bereits mehrere Übergänge vermutet wurden. Außerdem paßt dieser Übergang zu den relativ hohen Werten zwischen den Übergängen bei 20 °C und 47 °C in der differenzierten Schmelzkurve.

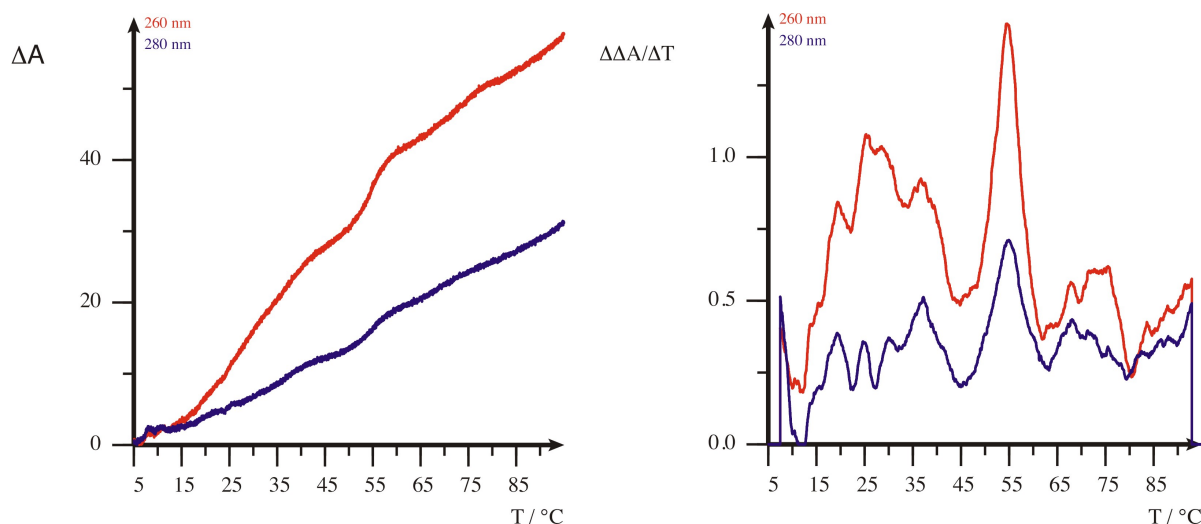


Abbildung 3.26: **Optische Schmelzkurven des Minimalkonstrukts in Anwesenheit von MgCl_2 .** Die optische Schmelzkurve des Minimalkonstrukts in integrierter (links) und differenzierter (rechts) Form. Bedingungen: 10 mM NaCl, 1 mM Nacacodylat, 0.1 mM EDTA, 10 μM MgCl_2 . Temperaturbereich: 5–95 °C. Heizrate: 1 °C/Minute

In Abb. 3.26 sind die Daten der optischen Schmelzkurve des Minimalkonstrukts in Anwesenheit von 10 μM MgCl_2 gezeigt. Auch hier entspricht die Ionenstärke der TGGE-Analyse. Anders als in der TGGE-Analyse sind die Übergänge von 20 °C und 47 °C hier um ca. 10 °C auf 30 °C und 56 °C verschoben, wie man es auch bei einer Erhöhung der Ionenstärke durch ein zweiwertiges Kation erwartet. Der Übergang bei 34 °C ist in Anwesenheit von MgCl_2 nicht mehr vorhanden, dafür wird der Übergang bei 30 °C gegenüber seinem korrespondierenden Übergang bei 20 °C ohne MgCl_2 breiter und flacher. Dies konnte so in der TGGE-Analyse nicht gezeigt werden. Es ist möglich, dass dies ein Effekt der indirekten Meßgröße „Gelmobilität“ bei der TGGE ist. Die Gelmobilität ändert sich – anders als die Hypochromie – nicht zwangsläufig mit dem Denaturierungsgrad.

Der dritte Übergang liegt bei 72 °C und entspricht vermutlich dem Übergang bei 68 °C ohne MgCl_2 . Dieser Übergang ist statt 10 °C nur um 4 °C verschoben und der beteiligte RNA-Bereich verhält sich damit deutlich anders. Wie oben bereits dargestellt, ist dieser Übergang ungewöhnlich, da hier wenige Basenpaare ein sehr stabiles Strukturelement zu bilden scheinen. Statt eines stabilisierenden Effekts scheinen Mg^{2+} -Ionen auf dieses Strukturelement eher eine destabilisierende Wirkung zu haben. Das könnte auch das Verhalten des Minimalkonstrukts in diesem Temperaturbereich in der TGGE-Analyse erklären. Dort zeigte sich nur bei diesem Übergang ein anderes Laufverhalten in Anwesenheit von Mg^{2+} -Ionen, das sich mit einer Destabilisierung des beteiligten Strukturelements erklären ließe.

In Abb. 3.27 ist die mit dem Programm **Linall** vorhergesagte theoretische Schmelzkurve

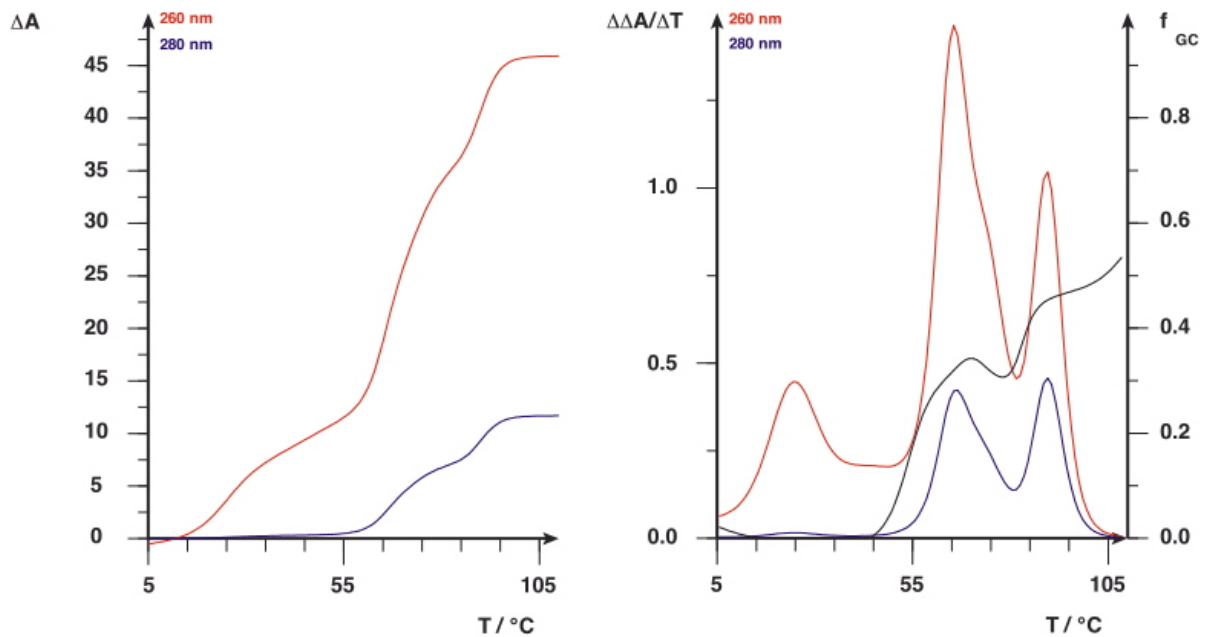


Abbildung 3.27: **Theoretische Schmelzkurve des Minimalkonstrukts.** Die theoretische Schmelzkurve des Minimalkonstrukts in integrierter (links) und differenzierter (rechts) Form. Die Berechnung erfolgte mit dem Programm **Linall** für eine Ionenstärke von 1 M NaCl bei 5–105°C.

gezeigt. Die theoretische Vorhersage wird für eine Ionenstärke von 1 M NaCl berechnet, so daß die Temperaturen für einen Vergleich durch einen Faktor an die experimentellen Bedingungen angepaßt werden müssen [58, 149]. Die theoretische Schmelzkurve sagt drei Übergänge bei 25°C, 67°C und 90°C vorher. Der Übergang bei 25°C konnte im experimentellen System nicht gezeigt werden, da er bei den verwendeten Ionenstärken um bzw. unter 0°C liegt. Der Übergang bei 70°C aus dem Experiment läge in der theoretischen Schmelzkurve bei ca. 125°C und wird von dem Graph nicht mehr dargestellt (5–105°C). Der Übergang bei 67°C in der theoretischen Schmelzkurve könnte dem bei 20°C in der experimentellen Schmelzkurve entsprechen und der bei 90°C dem bei 47°C. Die Übergänge sind in der theoretischen Schmelzkurve entsprechend der höheren Ionenstärke (1 M NaCl) um ca. 45°C zu höheren Temperaturen verschoben. Die beiden Übergänge, die hier verglichen werden können, liegen im Experiment 27°C und in der Theorie 23°C auseinander. Die vorhergesagte Höhe der Übergänge stimmt gut mit den experimentellen Daten überein, so daß es sehr wahrscheinlich ist, daß diese Übergänge der theoretischen Schmelzkurve denen der experimentellen Schmelzkurve entsprechen. Damit unterstützen die experimentellen Daten die theoretische Strukturvorhersage, von der hier beim Entwurf des Minimalkonstrukts ausgegangen wurde (siehe Kap. 3.5.1).

3.5.3 Chemische Strukturanalyse des Minimalkonstrukts

3.5.3.1 Modifizierung des Minimalkonstrukts mit DEPC

Eine vergleichende chemische Sekundärstrukturanalyse des Minimalkonstrukts mit dem *in vitro* Transkript (-86/+822) sollte zeigen, inwieweit die Sekundärstrukturen der beiden Transkripte übereinstimmen. DEPC (Diethylpyrocarbonat) modifiziert bei neutralem pH Wert einzelsträngig vorliegende Adenosinnukleotide, die auch durch Stapelwechselwirkungen strukturiert sein können, am Stickstoff N7 des Imidazolrings und erlaubt eine anschließende Spaltung mit Anilin an dieser Position. Auch Adenosinnukleotide, die an endständigen Helixbasenpaaren beteiligt sind, können modifiziert werden. Die Modifizierung erfolgte an 5'-endmarkierten *in vitro* Transkripten, deren Spaltprodukte auf einem Sequenzigel nukleotidgenau zugeordnet werden konnten.

Die Modifizierung sollte bei gleicher Sekundärstruktur bis zu einer Länge von etwa 120 nt identisch sein. Längere Fragmente haben bei (-86/+822) keine Entsprechung im Minimalkonstrukt (siehe dazu auch Abb. 3.23). In Abb. 3.28 ist die Modifizierung der beiden Transkripte gezeigt. Die Muster der Modifizierung waren bei beiden Transkripten bis zu einer Länge von 124 nt nahezu gleich. Die Nukleotide 22, 28, 32/33, 48, 56, 59, 62–64, 67–69, 71–73, 84, 101–107, 112–114 und 118–120 wurden in beiden Transkripten modifiziert. Alle diese Nukleotide sollten nach der theoretischen Sekundärstruktur auch durch DEPC modifizierbar sein, so daß die DEPC-Modifizierung die vorhergesagte Sekundärstruktur bestätigt (siehe Abb. 3.30). Die Nukleotide 124 und 140 wurden zwar sowohl bei dem Minimalkonstrukt als auch bei (-86/+822) modifiziert, aber aufgrund der Lage in der Sekundärstruktur bzw. Sequenz ist davon auszugehen, daß es sich hierbei nicht um korrespondierende Sequenzpositionen handelt. Dies zeigt sich auch in dem unterschiedlichen Signalmuster der Nukleotide 118–120, die einem Loop liegen, der zwar im Minimalkonstrukt weitgehend die gleiche Sequenz hat wie in (-86/+822), dort handelt es sich aber um einen Verzweigungsloop. Die einzige Ausnahme im Modifizierungsmuster ist die Modifikation von Nukleotid 91, die nur bei (-86/+822), nicht aber im Minimalkonstrukt modifiziert wird. Dies entspricht allerdings der für die Position 91 vorhergesagten Struktur. Im Minimalkonstrukt ist das entsprechende Nukleotid Teil einer Helix, die zugunsten der Stabilität der Sekundärstruktur eingeführt wurde (5'-Bereich: [+4(90)bis +6(92)]; 3'-Bereich: im Minimalkonstrukt →[130 bis 132] bzw. in Transkript (-86/+822) →Verzweigungsloop beginnend bei +456(542); siehe Abb. 3.23).

Die chemische Sekundärstrukturanalyse mit DEPC ergab ein identisches Modifizierungsmuster für die *in vitro* Transkripte des Minimalkonstrukts und (-86/+822), was die Annahme eines identischen Sekundärstrukturelements in beiden RNAs unterstützt. Der einzige Unterschied im Modifikationsmuster konnte auf eine Veränderung der Struktur beim Entwurf des Minimalkonstrukts zurückgeführt werden. Diese Daten stützen experimentell, daß das *in vitro* Transkript (-86/+822) die *in silico* vorhergesagte long range Wechselwirkung als Sekundärstrukturelement enthält.

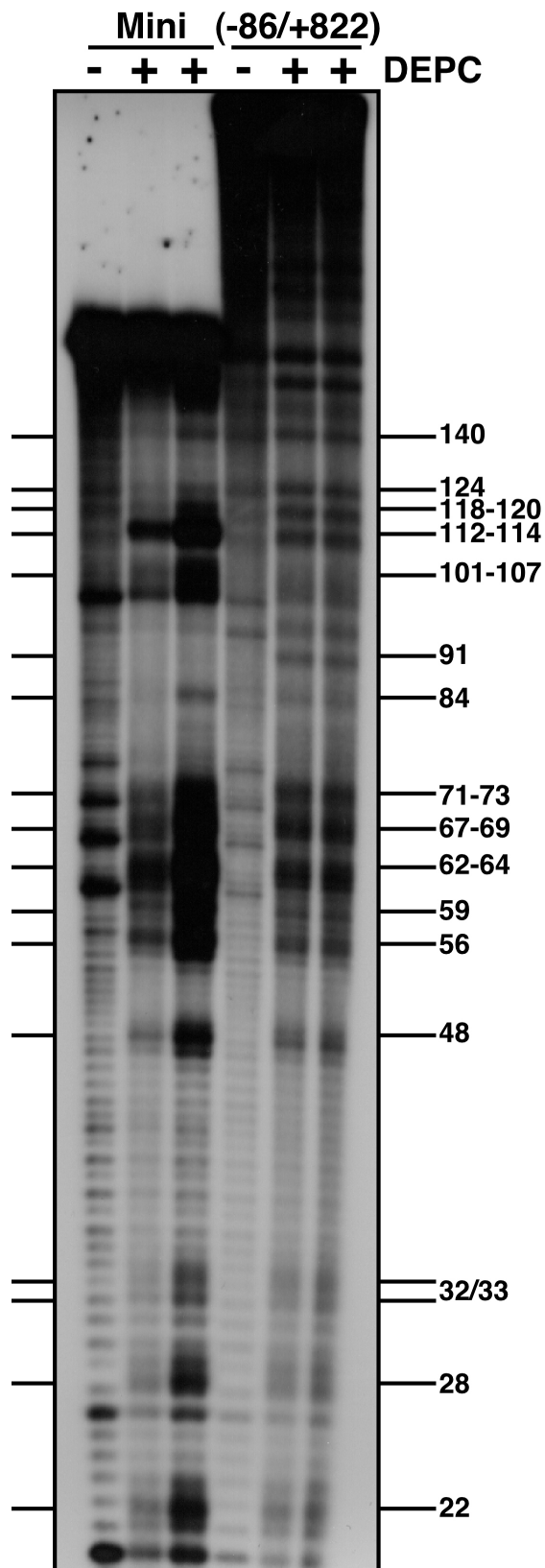


Abbildung 3.28: **Sekundärstruktur-analyse der Transkripte (-86/+822) und des Minimalkonstrukts mit DEPC.** Die Autoradiographie zeigt gelelektrophoretisch aufgetrennte Fragmente der *in vitro* Transkripte von (-86/+822) und dem Minimalkonstrukt nach DEPC-Behandlung und anschließender Spaltung mit Anilin. Für jedes Transkript wurde eine Kontrolle (H₂O statt DEPC) und zwei unabhängige, mit DEPC behandelte Ansätze aufgetragen. Die Größe der Fragmente >70 nt wurde über längere Laufzeiten ermittelt, die hier nicht gezeigt sind. Gelbedingungen: 8% PAA (Vernetzungsgrad 19:1), 1×TBE und 7 M Urea.

3.5.3.2 Spezifische Hydrolyse des Minimalkonstrukts mit Pb^{2+} -Ionen

Einen weiteren Hinweis auf die Übereinstimmung der Sekundärstruktur des Minimalonstrukts mit (-86/+822) sollte die spezifische Hydrolyse mit Pb^{2+} -Ionen liefern. Im 5'-Bereich wurden für das *in vitro* Transkript (-86/+822) bereits in früheren Experimenten zwei Mg^{2+} -abhängige Pb^{2+} -Spaltstellen an den Nukleotiden -5(81) und +26(113) beschrieben, wobei die Pb^{2+} -Spaltstelle an -5(81) auch im Vollängentranskript der *psbA* mRNA nachgewiesen werden konnte [143]. Da die spezifische Hydrolyse mit Pb^{2+} -Ionen stark strukturabhängig ist, sollten sich diese Pb^{2+} -Spaltstellen bei gleicher Struktur auch im Minimalkonstrukt zeigen. Das entsprechende Experiment ist in Abb. 3.29 gezeigt.

Von links nach rechts zeigen die ersten vier Spuren die Pb^{2+} -Spaltung mit 0, 0.5, 1 und 5 mM Bleiacetat ohne den Zusatz von Mg^{2+} -Ionen. Man sieht ein umfassendes Spaltungsmuster, das dem bereits bekannten Spaltungsmuster des 5'-Bereichs des *in vitro* Transkripts (-86/+822) ähnelt. Besonders auffällig sind zwei starke Signale bei einer Länge von 80 nt und 111 nt, die gut mit den bekannten Mg^{2+} -sensitiven Pb^{2+} -Spaltstellen in (-86/+822) übereinstimmen. In den benachbarten Spuren sind Pb^{2+} -Spaltreaktionen mit 1 bzw. 5 mM Bleiacetat aufgetragen, denen steigende Konzentrationen an Magnesiumacetat (0–200 mM $\text{Mg}(\text{OAc})_2$) zugesetzt wurden. Bereits bei 25 mM $\text{Mg}(\text{OAc})_2$ wird die Spaltung an den Positionen 80 nt und 111 nt durch Pb^{2+} -Ionen nahezu vollständig unterdrückt, während andere Signale diese Abhängigkeit von Mg^{2+} -Ionen nicht zeigen.

Die Fragmentlängen der Mg^{2+} -sensitiven Pb^{2+} -Spaltstellen des Minimalkonstrukts – 80 nt und 111 nt – weichen geringfügig von den für (-86/+822) bestimmten Spaltstellen – 81 nt und 113 nt – ab. Dieser Unterschied in der Fragmentlänge ist auf den unterschiedlichen Nachweis zurückzuführen: In (-86/+822) wurden die Spaltstellen durch Vergleich mehrerer experimenteller Ansätze eingegrenzt und durch Primer Extension Analyse nukleotidgenau bestimmt. Die Primer Extension Analyse ist für das Minimalkonstrukt aufgrund seiner Länge von nur 178 nt nicht aussagekräftig, da maximal 100 nt des 5'-Endes aufgelöst werden könnten und damit eine der diskutierten Spaltstellen (111 nt) nicht mehr erfaßt würde. Die Längenbestimmung mittels eines DNA-Längenstandards, wie sie hier durchgeführt wurde, birgt zum einen die Fehlerquelle, daß DNA und RNA nicht exakt gleiches Laufverhalten in denaturierenden PAA-Gelen zeigen. Zum anderen erfolgt die Längenbestimmung über eine Eichgerade, deren Qualität von Trennstrecke und Anzahl der Meßpunkte im fraglichen Trennbereich abhängt. Unter Berücksichtigung dieser Fehler ist davon auszugehen, daß die Pb^{2+} -Spaltstellen des Minimalkonstrukts denen von (-86/+822) entsprechen. Damit konnte gezeigt werden, daß das Minimalkonstrukt das gleiche Pb^{2+} -Spaltpattern wie (-86/+822) hat und die gleichen Pb^{2+} -Spaltstellen durch Mg^{2+} -Ionen unterdrückt werden. Das bestätigt ebenfalls, daß die *in vitro* Transkripte von (-86/+822) und dem Minimalkonstrukt das gleiche Sekundärstrukturelement enthalten.

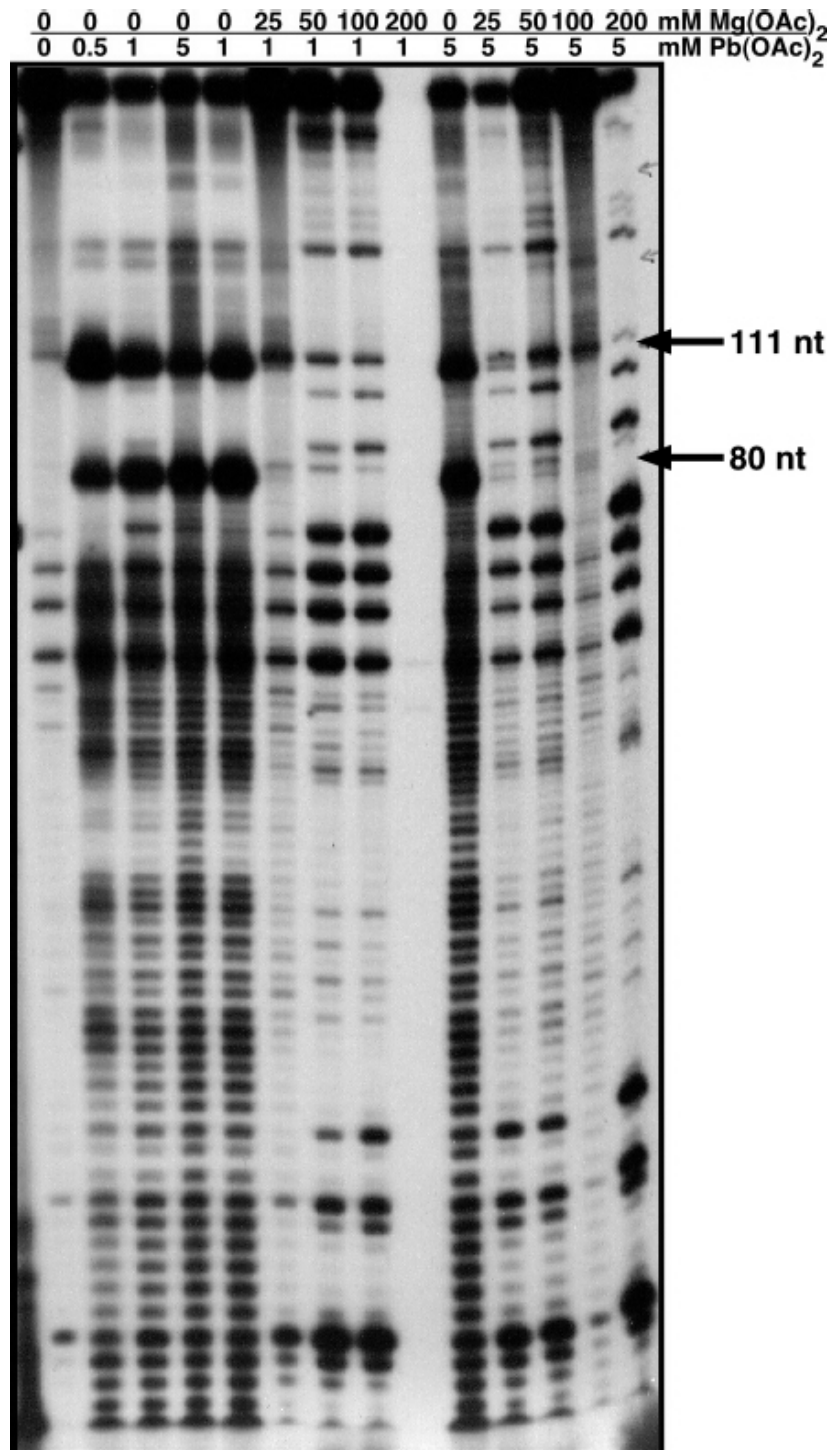


Abbildung 3.29: **Pb²⁺-Spaltung des Minimalkonstrukts in Gegenwart Mg²⁺-Ionen.** Die Autoradiographie zeigt gelelektrophoretisch aufgetrennte Fragmente 5'-endmarkierter Transkripte nach Pb²⁺-Spaltung in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen Mg(OAc)₂. Als Marker wurde mit *HinfI* restringiertes Plasmid pBR322 verwendet (nicht abgebildet). Gelbedingungen: 5% PAA (Vernetzungsgrad 30:0,8), 1×TBE und 8 M Urea.

3.5.3.3 Die Sekundärstruktur des Minimalkonstrukts

Die Daten aus der chemischen Modifizierung mit DEPC und der spezifischen Hydrolyse mit Pb^{2+} -Ionen des Minimalkonstrukts der *psbA* mRNA sind in Abb. 3.30 zusammenfassend dargestellt. Die jeweiligen Spaltstellen wurden hierzu in die theoretisch vorhergesagte Sekundärstruktur eingetragen. Die DEPC-Modifizierungen (kurze Pfeile) entsprechen den theoretisch ermittelten strukturellen Voraussetzungen und unterstützen daher experimentell diese Sekundärstruktur. Wie oben beschrieben, sind die Signalmuster weitgehend identisch mit denen für das *in vitro* Transkript (-86/+822), was sehr dafür spricht, daß auch dieses Transkript und damit vermutlich auch die Volllänge der *psbA* mRNA dieses Sekundärstrukturelement ausbildet.

Die durch spezifische Hydrolyse mit Pb^{2+} -Ionen identifizierten Spaltstellen (lange Pfeile) decken sich ebenfalls mit denen, die für das *in vitro* Transkript (-86/+822) beschrieben wurden. Für zwei prominente Pb^{2+} -Spaltstellen konnte eine Mg^{2+} -Abhängigkeit gezeigt werden. Diese Daten sprechen ebenfalls für das Vorkommen dieses Strukturelements in der *psbA* mRNA.

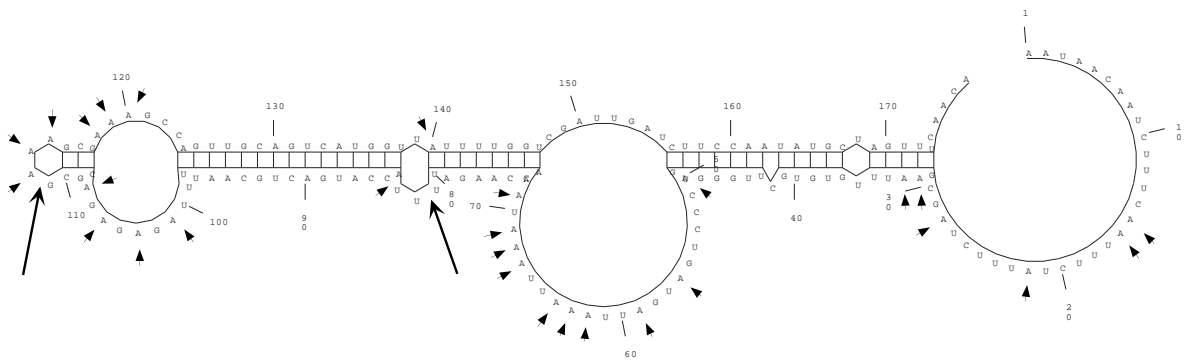


Abbildung 3.30: **Theoretische Sekundärstruktur des Minimalkonstruktes mit den Spaltstellen von DEPC/Anilin und Pb^{2+} -Ionen.** Die mit DEPC modifizierten Positionen sind mit kurzen Pfeilen gekennzeichnet, die Mg^{2+} -sensitiven Pb^{2+} -Spaltstellen mit langen Pfeilen.

4 Diskussion

Im Laufe der Chloroplastenentwicklung in höheren Pflanzen ist die differentielle mRNA Stabilität ein wichtiger Bestandteil der posttranskriptionalen Regulation der Genexpression. Der Mechanismus, durch den die differentielle Stabilisierung einer chloroplastenkodierten mRNA vermittelt wird, ist bisher noch nicht aufgeklärt. Aufgrund des für die *psbA* mRNA beschriebenen Abbauweges wird postuliert, daß die 5' UTR das *cis*-regulatorische Element für die Degradation enthält, da hier der den Abbau einleitende endonukleolytische Schnitt stattfindet. Über die Zugänglichkeit dieser Schnittstelle sollte daher auch die Stabilität der mRNA reguliert werden. Für die Regulation der Degradation wurden drei mögliche Modelle vorgeschlagen: (i) Schutz der endonukleolytischen Schnittstelle durch Bindung von Proteinen. (ii) Unterschiedliche Konformationen der RNA bedingen die Zugänglichkeit der Schnittstelle. (iii) Schützende Proteine werden in Abhängigkeit von der RNA-Struktur gebunden. Neben Proteinen und der mRNA könnten auch andere Faktoren an der Vermittlung der mRNA Stabilität beteiligt sein. Es wurde bereits gezeigt, daß Mg^{2+} -Ionen einen genspezifischen, stabilisierenden Effekt auf chloroplastidäre RNAs haben. Darüber hinaus unterliegt die Konzentration an freien Mg^{2+} -Ionen im Chloroplasten einer entwicklungspezifischen Änderung [67]. Zwei der Modelle zur Regulation der Stabilität erfordern eine Konformationsänderung der mRNA, die durch Mg^{2+} -Ionen induziert werden könnte.

Um zu zeigen, welche Strukturelemente der *psbA* mRNA mit Mg^{2+} -Ionen wechselwirken und an der Vermittlung der Stabilität beteiligt sein könnten, wurden in dieser Arbeit verschiedene kurze Sequenzabschnitte der *psbA* mRNA ausgewählt und im Hinblick auf ihre Thermodynamik und Sekundärstruktur untersucht. Weiterhin wurde die Methode der spezifischen Hydrolyse von RNA mit Pb^{2+} -Ionen auf 5'-seitig verkürzte *in vitro* Transkripte der *psbA* mRNA und auf die endogene mRNA *in organello* angewandt. Diese Methode erlaubte indirekte Aussagen über Bindestellen zweiwertiger Kationen auf der *psbA* mRNA und lieferte darüber hinaus Daten, die ein *long range* Strukturelement als wichtigen Bestandteil der Struktur der *psbA* mRNA zeigen. Die Daten werden im folgenden zusammenfassend im Hinblick auf Strukturelemente der *psbA* mRNA, die mit zweiwertigen Kationen interagieren und damit für die Vermittlung der Stabilität relevant sein könnten, diskutiert. Weiterhin werden die Ergebnisse dieser Arbeit in den Kontext der bereits bekannten Daten eingeordnet und daraus ein Modell für die entwicklungs-spezifische differentielle Stabilität der *psbA* mRNA abgeleitet.

4.1 Strukturelemente der *psbA* mRNA

4.1.1 Das 5'-Ende der *psbA* mRNA

Das *in vitro* Transkript (-86/+131) umfaßt die 5' UTR der *psbA* mRNA und reicht 131 nt in die kodierende Region. Frühere Daten favorisieren die 5' UTR als *cis*-regulatorisches Element für die Vermittlung der differentiellen Stabilität der *psbA* mRNA, da hier der Abbau initiiert endonukleolytische Schnitt stattfindet [66, 75]. Auch liegen in der 5' UTR zwei potentielle Schnittstellen für die Endonuklease RNase E [102], die als das den Abbau einleitende Enzym diskutiert wird. Der Bereich [-49(37) bis -9(77)] wurde durch Deletionsstudien als relevant für die Proteinbindung an die 5' UTR identifiziert. Dabei konnte zusätzlich gezeigt werden, daß die Proteinbindung an die 5' UTR von der RNA-Struktur abhängt [79]. Das Transkript (-86/+131) enthält weitere funktionale Elemente wie die potentielle Ribosomenbindestelle GGAG an Position [-40(46) bis -37(49)] und das Startcodon AUG an Position +1(87). An Position -5(81) konnte in früheren Arbeiten eine Mg²⁺-sensitive Pb²⁺-Spaltstelle gezeigt werden, so daß in diesem Sequenzbereich eine Bindestelle für zweiwertige Kationen vermutet wird [143]. Studien in transplastomem Tabak haben gezeigt, daß die 5' UTR der *psbA* mRNA allein nicht hinreichend ist, um eine andere RNA in gleichem Maße zu stabilisieren [42]. Daher mußte bei der Suche nach für die mRNA Stabilität relevanten Strukturelementen auch die kodierende Sequenz einbezogen werden.

Daraus ergab sich unter Berücksichtigung thermodynamischer Strukturvorhersagen das Transkript (-86/+131) als geeigneter Kandidat für ein stabilitätsrelevantes, Mg²⁺-sensitives Strukturelement, worauf die in dieser Arbeit durchgeführten thermodynamischen Strukturanalysen allerdings keine konkreten Hinweise lieferten. In der TGGE-Analyse konnten zwar schwache Effekte auf das Laufverhalten durch Mg²⁺-Ionen beobachtet werden. Die Sekundärstrukturanalyse mit DEPC legte jedoch nahe, daß hier lediglich vorhandene Strukturelemente stabilisiert bzw. destabilisiert werden, aber keine Strukturänderung zu beobachten ist. Das Laufverhalten des Transkripts in der TGGE-Analyse konnte nur teilweise mit der optischen Denaturierungskurve korreliert werden. Die theoretische Schmelzkurve konnte mit der experimentellen nicht in Einklang gebracht werden. Aus dieser Datenlage war nicht ersichtlich, welche Struktur das Transkript (-86/+131) einnimmt und ob es ein Mg²⁺-sensitives Strukturelement enthält.

Gegen ein solches Mg²⁺-sensitives Strukturelement in diesem Transkript spricht auch das Bindungsverhalten von chloroplastidären Proteinen an diesen Sequenzabschnitt. So konnte in früheren Arbeiten beobachtet werden, daß an die 5' UTRs verschiedener chloroplastenkodierter mRNAs in UV-Quervernetzungsexperimenten die gleichen Proteinsets binden. Alle untersuchten 5' UTRs zeigten jedoch eine Änderung des Proteinbindungsverhaltens in Anwesenheit von MgCl₂ oder EDTA in Gelverzögerungsexperimenten. Die 5' UTR der *psbA* mRNA bildete hier die einzige Ausnahme. Es wurden verschiedene Transkripte des 5'-Endes der *psbA* mRNA – auch das Transkript (-86/+131) – untersucht, aber bei keinem Transkript konnte ein Effekt von MgCl₂ auf das Proteinbindungsverhalten detektiert werden [119].

Der für Proteinbindung relevante Bereich [-49(37) bis -9(77)] fällt mit der Mehrheit der Stellen zusammen, die von DEPC modifiziert werden. Die Verteilungsfunktion der Sekundärstrukturanalyse gibt in diesem Sequenzabschnitt eine geringe Basenpaarungswahrscheinlichkeit an [119], so daß es sich hier um einen weitgehend unstrukturierten Bereich handelt. Da bei unterschiedlicher Ionenstärke keine Veränderungen im DEPC-Modifikationsmuster zu beobachten waren, sprechen die Daten insgesamt gegen eine Mg^{2+} -abhängige strukturelle Veränderung in diesem Bereich der mRNA, die zur Zugänglichkeit einer RNA-Bindestelle für spezifische Proteine – degradierend oder schützend – führt.

4.1.2 Der GAAA-Tetraloop

Die *psbA* mRNA enthält im Bereich [+22(108) bis +31(117)] einen GAAA-Tetraloop mit der Sequenz CGCGAAAGCG (Helix II in Abb. 4.1). In diesem Strukturelement befindet sich eine Mg^{2+} -sensitive Pb^{2+} -Spaltstelle an Position +26/+27(112/113). Es ist bekannt das GNRA-Tetraloops eine Bindestelle für Mg^{2+} -Ionen enthalten können [96, 131]. In Pb^{2+} -Spaltungsexperimenten führt dies nach Austausch des Mg^{2+} -Ions gegen ein Pb^{2+} -Ion zu einer Spaltung im Loopbereich. Diese Pb^{2+} -Spaltstelle ist in allen 5'- oder 3'-seitig verkürzten *in vitro* Transkripten zu detektieren. Die einzige Ausnahme bildet die Volllänge, bei der sowohl im *in vitro* Transkript [143] als auch in der endogenen mRNA *in organello* diese Spaltstelle nicht nachgewiesen werden kann. Das Fehlen der Pb^{2+} -Spaltstelle im Tetraloop in der Volllänge der *psbA* mRNA und ihr Auftreten im 3'-seitig verkürzten *in vitro* Transkript (-86/+822) deutet darauf hin, daß der Wechselwirkungspartner des Tetraloops im Bereich [+822(908) bis +1247(1333)] liegt. In diesem Sequenzabschnitt findet sich in der thermodynamisch optimalen Struktur ein ausgeprägtes Sekundärstrukturelement, das laut einer phylogenetischen, theoretischen Konsensusstruktur [66] eine konservierte Helix und zwei gegenüber der konservierten Struktur leicht abgewandelte Helices enthält, sowie die Haarnadelstruktur, die durch das 3'-IR ausgebildet wird und die ebenfalls konserviert ist.

Anhand evolutionärer Covariation der Loopsequenz mit Basen in sequentiell entfernten Helices konnte gezeigt werden, daß GNRA-Tetraloops an CC:GG-Tandembasenpaaren (Abb. 4.1; orange unterlegt) in die kleine Furche von RNA-Helices binden können [70]. Es sind bisher zwei längere Tetralooprezeptormotive beschrieben worden, die beide auch ein solches CC:GG Tandembasenpaar enthalten: das 11 nt-Motiv und das IC3-Motiv. Beide Motive unterscheiden sich nur geringfügig [69]. Das IC3-Motiv besteht aus dem zweigeteilten 12 nt langen Sequenzmotiv CCCUAAC – GAGGG. Es findet sich in der P8 Domäne von Gruppe IC3 Introns und erkennt einen Tetraloop der P2 Domäne [68]. Das 11 nt-Motiv besteht aus dem zweigeteilten 11 nt langen Sequenzmotiv CCUAAG – UAUGG. Es kommt ebenfalls in Gruppe I Introns vor und ist im Detail an der P4-P6 Domäne von Tetrahymena untersucht [21, 174]. Das 11 nt-Motiv kommt auch in der IRES (internal ribosomal entry site) des Aphthovirus vor, allerdings ist der korrespondierende Tetraloop noch nicht identifiziert [123]. In rRNAs gibt es eine Reihe

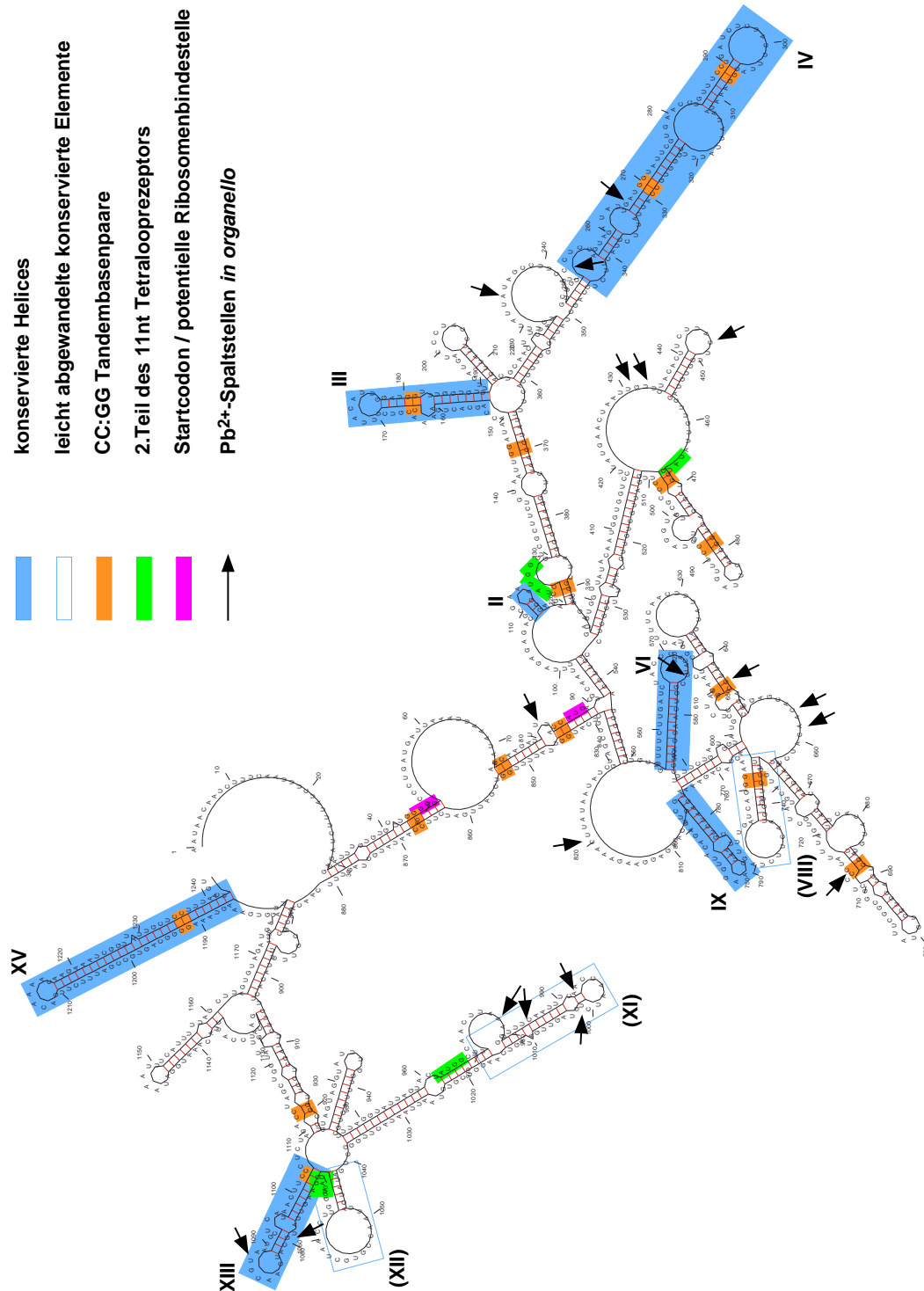


Abbildung 4.1: **Die theoretische Sekundärstruktur der psbA mRNA.** Die Abbildung zeigt die theoretische Sekundärstruktur der *psbA* mRNA mit den verschiedenen Elementen (siehe Legende). Die Pfeile markieren die Pb²⁺-Spaltstellen *in organello* (siehe 3.4.3). Die Numerierung der konservierten Sekundärstrukturelemente entspricht Horlitz, 2000 [66].

konservierter Tetraloops, von denen bekannt ist, daß sie an tertiären Wechselwirkungen beteiligt sind. Allerdings kommt keiner der beschriebenen Rezeptoren in rRNAs vor [174]. Daher wird angenommen, daß es noch weitere Sequenz- oder Struktur motive in RNAs gibt, die mit GNRA-Tetraloops wechselwirken und darüber wesentlich zur Ausbildung übergeordneter RNA-Strukturen beitragen.

Der GAAA-Tetraloop der *psbA* mRNA ist – mit Ausnahme des letzten Stammbasenpaares – stark konserviert [66]. Er wird *in silico* von allen bisher untersuchten Fragmenten der *psbA* mRNA, die diesen Sequenzabschnitt enthalten, gebildet. Vergleichende theoretische Analysen von Tetraloops aus rRNAs haben gezeigt, daß allen Tetraloops – insbesondere GAAA-Tetraloops, die in ihrer Loopsequenz und in ihrer Stammlänge konserviert sind – eine wichtige Funktion bei der Ausbildung übergeordneter Strukturen zugeschrieben wird [59]. Eine solche Rolle könnte der GAAA-Tetraloop der *psbA* mRNA ebenfalls spielen. Die *psbA* mRNA ist stark strukturiert, wobei vermutlich auch tertiäre Wechselwirkungen beteiligt sind. In der P4-P6 Domäne des Tetrahymena Group I Introns stabilisiert die Wechselwirkung eines GAAA-Tetraloops mit seinem Rezeptor in Abhängigkeit von Mg^{2+} -Ionen die nativ gefaltete Struktur [174]. Eine solche „Strukturklammer“ wäre auch für die *psbA* mRNA – insbesondere im Hinblick auf das unten diskutierte *long range* Strukturelement – denkbar. In der Sequenz der *psbA* mRNA kommt keiner der aus Gruppe I Introns bekannten Rezeptoren vor. Allerdings findet sich der 2. Teil des 11 nt-Motivs – UAUGG – viermal in der Sequenz von *psbA* (grün markiert in Abb. 4.1), davon zweimal im Bereich [+822(908) und +1247(1333)], wobei eines der Elemente in einer konservierten Helix liegt. Jedes der vier Elemente ist in der thermodynamisch optimalen Sekundärstruktur an der Bildung eines CC:GG Tandembasenpaares beteiligt oder liegt in unmittelbarer Nähe dazu. Insgesamt finden sich fünf CC:GG Tandembasenpaare in konservierten Helices, die auch Bestandteil der thermodynamisch optimalen Einzelstruktur sind. Zwei dieser Tandembasenpaare liegen im Bereich [+822(908) bis +1247(1333)]. Zwei weitere CC:GG Tandembasenpaare liegen im Bereich des *long range* Strukturelements. Es gibt daher viele potentielle Kandidaten, die mit dem GAAA-Tetraloop wechselwirken können, von denen zwei in dem Sequenzabschnitt am 3'-Ende der mRNA liegen, der durch sein Fehlen die Pb^{2+} -Spaltung im Tetraloop ermöglicht.

4.1.3 Das *long range* Strukturelement

Die thermodynamisch optimale Sekundärstruktur der *psbA* mRNA sagt ein *long range* Strukturelement vorher, daß hauptsächlich von den Bereichen [-86(1) bis +34(120)] und [+753(839) bis +822(908)] gebildet wird (siehe dazu Abb. 3.23, S. 80). Es ist sehr unwahrscheinlich, daß ein solches Strukturelement in der nativen Struktur enthalten ist, da für seine Ausbildung ungefähr 900 nt – also 3/4 der gesamten Sequenz – synthetisiert sein müssen, bevor es sich falten kann. Eine RNA-Kette faltet sich aber sequentiell – parallel zu ihrer Synthese, was bei diesen Strukturrechnungen nicht berücksichtigt wird. Das bedeutet, daß vermutlich für die Bildung des *long range* Strukturelements lokale

Strukturen wieder aufgelöst werden müssen, was in der Regel energetisch ungünstig ist. Auch die Energielandschaft der *psbA* mRNA lieferte keinen Hinweis darauf, daß ein solches Strukturelement energetisch favorisiert sein könnte.

In vivo muß zusätzlich berücksichtigt werden, daß eine mRNA noch während der Synthese mit Proteinen assoziiert oder auch bereits in Polysomen assembliert wird, so daß die Faltungsmöglichkeiten einer mRNA stark eingeschränkt sind und sich vermutlich nur auf lokale Strukturelemente beschränken. Diese Annahme wird durch eine *in silico* Analyse der Konsensusstruktur der *psbA* mRNA bestätigt, in die 14 Sequenzen aus verschiedenen Pflanzen eingingen, und die zeigte, daß die Einzelstrukturen zwar einen starken Strukturierungsgrad aufweisen, aber die Konsensusstruktur nur 15 lokale Helices als konserviert angibt. Von diesen konservierten Helices kommen in der Einzelstruktur der *psbA* mRNA aus *Spinacea oleracea*, auf die sich die Experimente dieser Arbeit beziehen, sieben unverändert, drei abgewandelt und fünf gar nicht vor. Allerdings kommt nur eine der fehlenden konservierten Helices in der Einzelstruktur aufgrund des *long range* Strukturelements nicht vor [66].

Die vorliegende Arbeit liefert nun fundierte experimentelle Hinweise, die – entgegen der theoretischen Konsensusstruktur – für die Existenz des in der Einzelstruktur vorhergesagten *long range* Strukturelements in der *psbA* mRNA sprechen. So konnten durch Bestrahlung mit UV-Licht sequentiell entfernte RNA-Bereiche spezifisch quervernetzt werden. Die spezifische Hydrolyse 5'-seitig verkürzter *in vitro* Transkripte mit Pb^{2+} -Ionen gab einen Hinweis auf die Beteiligung des Bereichs [+457(543) bis +761(847)] an einer übergeordneten Struktur, die mit zunehmender Verkürzung des 5'-Endes nicht mehr gebildet werden kann und dadurch die Spaltung mit Pb^{2+} -Ionen an mehreren Stellen in diesem Bereich möglich wird. Die in dieser Arbeit etablierte spezifische Hydrolyse mit Pb^{2+} -Ionen *in organello* zeigte, daß zwei Pb^{2+} -Spaltstellen, die ausschließlich im *in vitro* Transkript (-86/+822) vorkommen, ebenfalls korrespondierende Pb^{2+} -Spaltstellen in diesem Bereich *in organello* haben. Das bestätigt, daß es in der *psbA* mRNA definierte Bindestellen für zweiwertige Kationen gibt, die in Abhängigkeit von der Struktur in geeigneter Position für eine spezifische Spaltung der *psbA* mRNA an den detektierten Stellen stehen. Die spezifische Hydrolyse mit Pb^{2+} -Ionen *in organello* zeigte außerdem, daß alle detektierten Pb^{2+} -Spaltstellen in einzelsträngigen Bereichen der thermodynamisch optimalen Struktur liegen und somit gut mit der theoretischen Struktur in Einklang stehen. Die geringe Anzahl der *in organello* detektierten Pb^{2+} -Spaltstellen läßt außerdem auf eine hohe Spezifität der Bindung der spaltenden Ionen schließen. Ein Vergleich der Spaltung mit Pb^{2+} -Ionen verschiedener 5'- und 3'-seitig verkürzter *in vitro* Transkripte und *in organello* (diese Arbeit und [143]) zeigte außerdem die oben diskutierte Abhängigkeit der Spaltung im GAAA-Tetraloop von der Transkriptlänge, die ebenfalls ein starkes Indiz für eine ausgeprägte übergeordnete Struktur ist.

Den stärksten Hinweis auf die Existenz des *long range* Strukturelements lieferte die vergleichende Analyse mit einem Minimalkonstrukt, das nur das fragliche Strukturelement bildet und keine weiteren Sequenzabschnitte enthält. Das Minimalkonstrukt besteht aus den Bereichen [-86(1) bis +34(120)] und [+753(839) bis +822(908)] der

Originalsequenz. Ein Loopbereich wurde zugunsten der Stabilität der Sekundärstruktur geschlossen und ein anderer in Anlehnung an die Ursprungssequenz ergänzt. Der GAAA-Tetraloop ist in dem Konstrukt enthalten. Die Sekundärstrukturanalyse des Minimalkonstrukts mit DEPC zeigte eine nahezu vollständige Übereinstimmung mit dem Modifikationsmuster des Transkripts (-86/+822). Das impliziert, daß beide Transkripte die gleiche Sekundärstruktur haben, die von den gleichen Sequenzabschnitten ausgebildet wird. Für das Transkript (-86/+822) bedeutet das, daß das *long range* Strukturelement Bestandteil seiner Sekundärstruktur ist. Auch die Mg²⁺-sensitiven Pb²⁺-Spaltstellen, die im Minimalkonstrukt gezeigt werden konnten Position 81 und Position 111, decken sich mit denen, die für das Transkript (-86/+822) beschrieben sind [143]. Der Spaltstelle an Position -5(81) kommt dabei besondere Bedeutung zu. An dieser Position findet in 3'-seitig verkürzten Transkripten, die laut theoretischer Struktur das *long range* Strukturelement nicht mehr ausbilden, keine Spaltung durch Pb²⁺-Ionen mehr statt, so daß diese Spaltstelle ein weiterer Indikator für das *long range* Strukturelement ist [143].

4.2 Die *psbA* mRNA: Ein RNA-Strukturschalter?

In jüngster Zeit wurden RNA-Strukturen, in den untranslatierten Bereichen von mRNAs beschrieben, die direkt mit einem Metabolit in Wechselwirkung treten und darüber die Expression verschiedener Gene des Stoffwechselweges des betreffenden Metaboliten reguliert wird. Diese Strukturen werden Riboswitch genannt. Sie entsprechen den künstlich erzeugten RNA-Aptameren, haben allerdings eine viel größere Spezifität für ihr Substrat [118, 167]. Es handelt sich hierbei vermutlich um einen der evolutiv ältesten Wege zur Regulation der Genexpression. Riboswitch-Elemente wurden zuerst in Bakterien gefunden und zunächst als „molekulares Fossil“ betrachtet, mittlerweile sind aber auch ähnliche Mechanismen bei mRNAs aus Säugern, die mit dem Immunsystem assoziiert sind, beschrieben [71].

Im Falle der *psbA* mRNA ist es allerdings nicht ganz zutreffend von einem Riboswitch zu sprechen. Bei den in Bakterien beschriebenen Riboswitch-Elementen handelt es sich um kurze Sekundärstrukturelemente, die mit hoher Spezifität einen Metabolit binden. Mg²⁺-Ionen könnte man zwar an die Stelle eines Metaboliten setzen, aber ihre Wechselwirkung mit der *psbA* mRNA kann anhand der vorliegenden Daten nicht auf ein kleines Strukturelement reduziert werden. Die Ergebnisse zur Wechselwirkung von Mg²⁺-Ionen mit der *psbA* mRNA lassen sich besser im Hinblick auf Untersuchungen zur Mg²⁺-abhängigen Faltung struktureller RNAs – wie dem Tetrahymena Gruppe I Intron oder ribosomaler RNAs – interpretieren [105, 107, 121]. Trotzdem läßt sich aus den Daten ein Schaltermechanismus für die Stabilisierung der *psbA* mRNA durch Mg²⁺-Ionen ableiten, wenn auch nicht im Sinne eines bakteriellen Riboswitch-Elements, sondern vergleichbar einer in *Bacillus subtilis* beschriebenen mit Proteinbindung interferierenden Tertiärstruktur [137] oder den thermo-sensitiven Elementen in bakteriellen Heat-shock Genen [26].

4.2.1 Mg²⁺-Ionen und die Struktur der *psbA* mRNA

Die Konzentration freier Mg²⁺-Ionen spielt eine maßgebliche Rolle bei der Faltung von Nukleinsäuren und der Ausbildung übergeordneter Strukturen [105, 107, 121]. Im reifen Chloroplasten liegen Mg²⁺-Ionen in ausreichenden Konzentrationen vor, um einen entscheidenden Einfluß auf die vorhandenen Nukleinsäuren auszuüben. Der Einfluß reicht soweit, daß eine genspezifische Stabilisierung chloroplastidärer mRNAs durch Mg²⁺-Ionen gezeigt werden konnte. Im Fall der *psbA* mRNA ist der durch Mg²⁺-Ionen induzierte Stabilisierungseffekt ausreichend, um die entwicklungsspezifische Stabilisierung *in organello* zu erklären [67]. Die Identifizierung spezifischer Pb²⁺-Spaltstellen auf der *psbA* mRNA *in vitro* und *in organello*, sowie die Mg²⁺-Abhängigkeit einiger Spaltstellen zeigt die spezifische Interaktion der *psbA* mRNA mit zweiwertigen Kationen an definierten Bindestellen. Dies legt nahe, daß Mg²⁺-Ionen für die Ausbildung der Struktur der *psbA* mRNA relevant sind und diese Struktur eine biologische Funktion hat.

An diversen Beispielen ist die Beteiligung gebundener Mg²⁺-Ionen an der Ausbildung von Tertiärstrukturen beschrieben [105]. Ein immer wieder kehrendes Motiv ist dabei der Tetraloop – insbesondere der GAAA-Tetraloop, der oben bereits ausführlich diskutiert wurde. Im Rahmen dieser Arbeit konnte zwar kein Rezeptor für den GAAA-Tetraloop der *psbA* mRNA identifiziert, aber seine Lage auf den Sequenzbereich [+822(908) bis +1247(1333)] eingegrenzt werden. Die Veränderungen im Pb²⁺-Spaltmuster der *in vitro* Transkripte mit zunehmender Verkürzung legen weiterhin die Beteiligung des Sequenzbereichs [+457(543) bis +761(847)] an einer übergeordneten Struktur nahe. Inwieweit hier Mg²⁺-Ionen maßgeblich für die Ausbildung einer solchen Struktur sind, kann nicht beantwortet werden. Allerdings finden sich Pb²⁺-Spaltstellen in dem betreffenden Sequenzabschnitt, die auf spezifische Bindestellen für zweiwertige Kationen zurückzuführen sind.

Das Minimalkonstrukt zeigt durch Mg²⁺-Ionen in der optischen Schmelzkurve eine deutliche Stabilisierung und Veränderungen im Denaturierungsverhalten. Hier scheinen Mg²⁺-Ionen einen direkten stabilisierenden Einfluß auf die Sekundärstrukturelemente zu haben, da die Ausbildung einer Tertiärstruktur für das Minimalkonstrukt unwahrscheinlich ist. So ist anzunehmen, daß die Bindung eines Mg²⁺-Ions in den Loop bei Position -5(81) – die durch die Mg²⁺-Abhängigkeit dieser Pb²⁺-Spaltstelle gezeigt wurde – diesen Loop und damit die flankierenden Helices stabilisiert. Eine vergleichbare stabilisierende Wirkung könnten auch an anderer Stelle gebundene Mg²⁺-Ionen auf lokale Strukturelemente ausüben.

Während der Chloroplastenentwicklung steigt die Mg²⁺-Konzentration im Organell von 3–4 mM auf 8–10 mM an. Dieser Anstieg der Mg²⁺-Konzentration korreliert mit der Stabilisierung, die die *psbA* mRNA im Laufe der Chloroplastenentwicklung erfährt und die auch im *in vitro* Degradationssystem bestätigt werden konnte [67]. Die Zugänglichkeit der mRNA für Endonukleasen scheint in jungen Chloroplasten besser zu sein, so daß ihre Abbaurate höher ist als im reifen Chloroplasten. Da die Nukleasen im Chloroplasten eine hohe Spezifität für einzelsträngige Nukleinsäuren aufweisen, könnten endonukleo-

lytische Schnittstellen allein durch Basenpaarung – auch in Tertiärstrukturelementen – geschützt werden [66]. Ein denkbare Modell, das den entwicklungspezifischen Anstieg der Mg^{2+} -Konzentration berücksichtigt, ist, daß die *psbA* mRNA sich während bzw. nach ihrer Synthese – entsprechend dem gängigen Modell der RNA-Faltung – durch einen Kollaps in eine intermediäre Struktur faltet, die bereits die meisten Sekundärstrukturelemente enthält. Diese intermediäre Struktur faltet sich dann weiter in die native Struktur, wobei die Geschwindigkeit der Faltung durch Mg^{2+} -Ionen drastisch erhöht wird (siehe dazu auch [107], [174]). Die intermediäre Struktur könnte im Falle der *psbA* mRNA durch ihre unvollständige Faltung für Nukleasen weitgehend zugänglich sein und rasch abgebaut werden. Sind aber Mg^{2+} -Ionen in ausreichender Konzentration vorhanden, existiert der intermediäre Zustand nicht lang genug, da eine rasche Faltung in eine kompakte, übergeordnete Struktur erfolgt, in der die endonukleolytischen Schnittstellen maskiert sind. Ein bereits bekanntes Beispiel für die Konkurrenz einer Tertiärstruktur in einer mRNA mit der Bindung von Proteinen ist das *trp* Operon aus *Bacillus subtilis*. Hier konnte gezeigt werden, daß die untranslatierte Region des *trp* Operons eine durch Mg^{2+} -Ionen induzierte Tertiärstruktur einnehmen kann. Diese Tertiärstruktur interferiert mit der Bindung des Proteins TRAP (*trp* RNA-binding attenuation protein), das eine Rolle bei der Translationsregulation dieses Operons spielt [137].

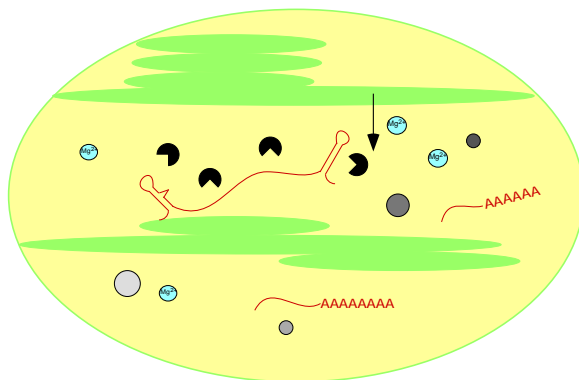
4.2.2 Zwei Populationen der *psbA* mRNA – ein Modell

Aus den bisher diskutierten Daten resultiert die Vorstellung, daß die *psbA* mRNA im reifen Chloroplasten – bei einer Mg^{2+} -Konzentration von ca. 10 mM – in einer durch Tertiärstrukturelemente kompakt gefalteten Struktur vorliegt, die ein zentrales *long range* Strukturelement enthält. Dieses *long range* Strukturelement verbindet den Bereich um das Startcodon und die potentielle Ribosomenbindestelle – die hier beide basengepaart vorliegen – mit einem Bereich am 3'-Ende der kodierenden Sequenz. Eine solche Struktur bietet zwar großen Schutz vor nukleolytischem Abbau, würde aber auch die Translation der mRNA verhindern.

Eine Erklärung für dieses Paradoxon könnten ältere Untersuchungen zur Halbwertszeit und dem Polysomenbesatz der *psbA* mRNA liefern [77]. Die Halbwertszeit der *psbA* mRNA aus Spinat wurde unter Verwendung des Transkriptioninhibitors Actinomycin D in jungen Blättern mit 4,5 h und in reifen Blättern mit 10 h bestimmt. Es ist bekannt, daß die *psbA* mRNA in Chloroplasten in zwei Populationen vorliegt: als ribosomenfreie mRNA und als polysomenassoziierte mRNA. Zur Stabilitätsanalyse der beiden Populationen wurden Translationinhibitoren eingesetzt: Chloramphenicol, das die Peptidyl-Transferase-Reaktion hemmt und so zu einer weitgehend mit blockierten Ribosomen besetzten *psbA* mRNA führt, und Lincomycin, das die Assemblierung von Ribosomen an der mRNA inhibiert und so die *psbA* mRNA in eine einheitliche Population mit einem entsprechend geringeren Polysomenbesatz überführt. Die durch Behandlung mit Chloramphenicol mit Polysomen besetzte *psbA* mRNA Population zeigte eine geringere Stabilität als die durch Behandlung mit Lincomycin in eine ribosomenfreie überführte

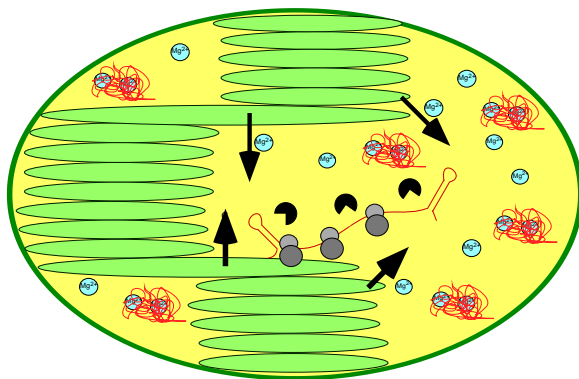
Population der *psbA* mRNA. Zudem konnte generell eine Erhöhung der Halbwertszeit nach Behandlung mit Lincomycin beobachtet werden, was dafür spricht, daß die Translation der *psbA* mRNA die Degradation begünstigt oder sogar initiiert. Eine mögliche Erklärung für diesen Effekt ist, daß durch die Assemblierung der mRNA mit Ribosomen vor Nukleasen schützende Strukturen der mRNA aufgelöst werden.

Daraus ergibt sich ein Modell, in dem man zwei Populationen der *psbA* mRNA unterscheiden kann: eine stabile, ribosomenfreie und eine instabile, polysomenassoziierte (siehe Abb. 4.2). Die stabile, ribosomenfreie Population fungiert als mRNA-Speicher für das bei Belichtung ständig zu synthetisierende Protein D1. Ein mRNA-Molekül dagegen, das einmal in die Translationsmaschinerie gelangt, wird rasch abgebaut. Ein solches Modell würde eine flexible Regulation der Translation erlauben und dabei die *psbA* mRNA als Matrize – in einer vor Degradation geschützten Struktur – jederzeit präsent halten.



Chloroplast nach 12 h Belichtung

- Die Konzentration an freien Mg^{2+} -Ionen ist gering (ca. 4mM).
- Die *psbA* mRNA ist nur in primäre Sekundärstrukturen gefaltet und daher zugänglich für endonukleolytische Angriffe.



Differenzierter Chloroplast

- Die Konzentration an freien Mg^{2+} -Ionen ist hoch (über 10mM).
- Die *psbA* mRNA liegt in zwei Formen vor:
 1. eine ribosomenbesetzte Form, die für Nukleasen zugänglich ist, da übergeordnete Strukturen aufgehoben werden.
 2. eine ribosomenfreie Form, die durch gebundene Mg^{2+} -Ionen stark strukturiert und daher vor nukleolytischen Angriffen geschützt ist.

Abbildung 4.2: **Das Modell der Regulation der Stabilität der *psbA* mRNA durch Mg^{2+} -Ionen.** Die Abbildung zeigt schematisch wie die Stabilisierung der *psbA* mRNA im Laufe der Chloroplastenentwicklung ablaufen könnte. Detaillierte Erläuterungen finden sich im Abschnitt 4.2.2.

Da im noch nicht reifen Chloroplasten oder im Etioplasten die *psbA* mRNA nicht benötigt wird und die Synthese des Protein D1 viel Energie verbrauchen würde, wäre eine stabile Form der mRNA hier ungünstig. Die Mg^{2+} -Konzentration steigt im Chloroplasten im Laufe der Entwicklung infolge der zunehmenden photosynthetischen Aktivität an. Die Ausbildung der kompakten, stabilen mRNA-Struktur als Antwort auf eine Erhöhung der Konzentration freier Mg^{2+} -Ionen, koppelt daher die Stabilisierung der mRNA an den Redoxzustand und damit an den Photosynthesestatus des Organells. Ist die maximale Mg^{2+} -Konzentration im Stroma erreicht und die *psbA* mRNA maximal stabilisiert, erfolgt die weitere Regulation der Translation nicht mehr durch die differentielle Stabilität sondern über andere posttranskriptionale Mechanismen, wie z. B. über den Oxidationszustand regulierte Translationsfaktoren [35].

4.3 Ausblick

Die in dieser Arbeit vorgestellten Daten untermauern die Annahme, daß zweiwertige Kationen – namentlich Mg^{2+} -Ionen – maßgeblich an der Faltung der *psbA* mRNA aus *Spinacea oleracea* beteiligt sind. Im weiteren gilt es zu untersuchen, inwieweit die hier postulierten Tertiärstrukturen experimentell nachgewiesen werden können. Dazu könnte die Wechselwirkung von Transkripten, die einzelne Sekundärstrukturbereiche der thermodynamisch optimalen Struktur repräsentieren, untereinander – in Abhängigkeit von Mg^{2+} -Ionen – untersucht werden. Ein solcher Ansatz sollte eine Eingrenzung des Tetralooprezeptors und der Wechselwirkungspartner des Bereichs [+457(543) bis +761(847)] erlauben. Die Struktur solcher Transkripte sollte durch chemische Sekundärstrukturanalyse leicht zu bestimmen sein und aufgrund ihrer Länge sollten diese Transkripte zumindest teilweise auch für thermodynamische Analysen geeignet sein.

Ein anderer Ansatz um die Struktur und Faltung der *psbA* mRNA weiter zu charakterisieren, ist das Design eines Vektors für die Transkription in einem chloroplastidären *in vitro* Transkriptionssystem [150]. Die Analyse von Transkriptionsintermediaten der *psbA* mRNA in einem *in vitro* Transkriptionssystem könnte Aufschluß über die Strukturelemente, die sich bereits während der Synthese falten und die Wirkung von Mg^{2+} -Ionen auf die Faltung der mRNA geben.

Um das oben beschriebene Modell experimentell abzusichern, sind zwei Ansätze denkbar. Zum einen gilt es die zwei Populationen der *psbA* mRNA getrennt aufzureinigen und zu untersuchen, zu welchen Teilen die mRNA in den beiden Formen vorliegt. Wenn die kompakte, stark strukturierte Form als mRNA-Speicher dient, sollte die größere Menge der *psbA* mRNA ribosomenfrei vorliegen. Auch sollten sich die beiden Populationen experimentell in ihrer Struktur unterscheiden lassen. Dafür können als Marker die bereits identifizierten strukturabhängigen Pb^{2+} -Spaltstellen dienen. Auch kann man für ausgewählte Sequenzbereiche – die gesamte mRNA ist aufgrund ihrer Länge mit solchen Methoden nur schwer zu erfassen – vergleichende chemische Sekundärstrukturanalysen durchführen.

Eine andere wichtige Frage, die sich bei dem oben beschriebenen Modell stellt, ist die Universalität des Mg^{2+} -Effekts in höheren Pflanzen. Sollte es sich hier um ein allgemeines Prinzip der genspezifischen Stabilisierung der *psbA* mRNA handeln, sollte der Mg^{2+} -Effekt auch in anderen Pflanzen gezeigt werden können. Im weiteren können – wenn der Mg^{2+} -Effekt auf die *psbA* mRNA in wenigstens einer weiteren Pflanze gezeigt ist – die Strukturen der homologen mRNAs vergleichend untersucht werden, was die Identifizierung gleicher oder ähnlicher Strukturelemente, die an der Vermittlung dieses Effekts beteiligt sind, vereinfachen würde. Auch bietet ein anderes pflanzliches System – wie *Arabidopsis thaliana* oder *Nicotiana tabacum* – bessere Möglichkeiten im Hinblick auf Mutationsstudien.

5 Zusammenfassung

Im Laufe der Chloroplastenentwicklung in höheren Pflanzen ist die differentielle mRNA Stabilität ein wichtiger Bestandteil der posttranskriptionellen Regulation der Genexpression. Der Mechanismus, durch den die differentielle Stabilisierung einer mRNA vermittelt wird, ist bisher noch nicht aufgeklärt. Neben Proteinen werden auch andere Komponenten als *trans*-regulatorische Faktoren diskutiert, die an der Vermittlung der mRNA Stabilität beteiligt sein könnten. So ist gezeigt worden, daß Mg^{2+} -Ionen einen genspezifischen, stabilisierenden Effekt auf chloroplastidäre RNAs haben und darüber hinaus die Konzentration an freien Mg^{2+} -Ionen im Chloroplasten einer entwicklungspezifischen Änderung unterliegt [67]. Die *psbA* mRNA, die für das D1 Protein des Photosystem II kodiert, unterliegt in hohem Maße dieser entwicklungspezifischen Stabilisierung. Auf diesen Ergebnissen aufbauend wurde in dieser Arbeit die Wechselwirkung der *psbA* mRNA mit Mg^{2+} -Ionen charakterisiert, um Hinweise auf den Mechanismus der Stabilisierung zu erhalten. Daher wurden Mg^{2+} -Bindestellen auf der *psbA* mRNA lokalisiert und ihre Abhängigkeit von der RNA-Struktur untersucht, sowie ein Minimalkonstrukt für ein *long range* Strukturelement entworfen und analysiert.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden kurze Sequenzabschnitte der *psbA* mRNA ausgewählt und im Hinblick auf ihre Thermodynamik und Sekundärstruktur in Abhängigkeit von Mg^{2+} -Ionen untersucht. Besonderes Augenmerk lag auf dem 5'-Ende der *psbA* mRNA, das aufgrund des beschriebenen Abbauweges vermutlich das *cis*-regulatorische Element für die Stabilität enthält. Daher wurde – gestützt von theoretischen Analysen – ein Sequenzabschnitt am 5'-Ende der *psbA* mRNA ausgewählt und durch TGGE-Analysen und optische Denaturierungskurven thermodynamisch untersucht. Außerdem wurde die Sekundärstruktur des 5'-Endes durch Modifikation mit DEPC analysiert. Alle Untersuchungen wurden unter verschiedenen Mg^{2+} -Konzentrationen durchgeführt, lieferten jedoch keinen Hinweis auf ein Mg^{2+} -abhängiges Strukturelement in dem ausgewählten Sequenzabschnitt.

Die Quervernetzung des *in vitro* Transkripts (-86/+822) mit UV-Licht zeigte, daß es in diesem Transkript definierte *long range* Wechselwirkungen gibt, die zum Teil eine Abhängigkeit von Mg^{2+} -Ionen zeigten. Um diese Mg^{2+} -abhängigen Strukturelemente in der *psbA* mRNA näher einzugrenzen, wurde die Methode der spezifischen Hydrolyse von RNA mit Pb^{2+} -Ionen auf 5'-seitig verkürzte *in vitro* Transkripte der *psbA* mRNA und auf die endogene mRNA *in organello* angewandt. Für die Analyse der endogenen mRNA wurde in dieser Arbeit die Pb^{2+} -Spaltung *in organello* etabliert. Dadurch war es möglich die Pb^{2+} -Spaltstellen auf der *psbA* mRNA unter physiologischen Bedingungen zu bestimmen. Insgesamt konnten 20 Spaltstellen *in organello* detektiert werden, von

denen acht mit Pb^{2+} -Spaltstellen in *in vitro* Transkripten korrespondieren. Durch den Vergleich verschiedener 5'-seitig verkürzter Transkripte konnte gezeigt werden, daß der Bereich [+457(543) bis +761(847)] an einer *long range* Wechselwirkung beteiligt ist. Eine zusammenfassende Analyse der Daten dieser Arbeit mit bereits bekannten Pb^{2+} -Spaltpatternen 3'-seitig verkürzter Transkripte der *psbA* mRNA konnte die Position eines potentiellen GAAA-Tetralooprezeptors auf den Bereich [+822(908) bis +1247(1333)] eingegrenzen.

Im dritten Teil dieser Arbeit wurde ein *long range* Strukturelement zwischen 5'- und 3'-Ende der *psbA* mRNA charakterisiert, das von der thermodynamisch optimalen Sekundärstruktur vorhergesagt wurde und für dessen Ausbildung in der *psbA* mRNA es einige experimentelle Hinweise gab [143]. Ziel war es, die Struktur dieses *long range* Strukturelements und seine Wechselwirkung mit Mg^{2+} -Ionen zu analysieren, sowie das Auftreten dieses Elements in der Struktur der *psbA* mRNA zu zeigen. Dabei wurde als Referenz das 3'-seitig verkürzte *in vitro* Transkript (-86/+822) der *psbA* mRNA verwendet.

Zunächst wurde aufgrund der theoretischen Strukturvorhersage die Sequenz des Minimalkonstrukts im Hinblick auf die Sekundärstruktur ausgewählt und anschließend dieses Minimalkonstrukt synthetisch hergestellt. Das *in vitro* Transkript des Minimalkonstrukts wurde thermodynamisch durch TGGE-Analysen und optische Denaturierungskurven unter verschiedenen Mg^{2+} -Konzentrationen analysiert. Die Ergebnisse der optischen Denaturierungskurve weisen auf eine starke Wechselwirkung mit Mg^{2+} -Ionen hin. Die Sekundärstruktur des Minimalkonstrukts wurde vergleichend mit dem *in vitro* Transkript (-86/+822) durch Modifikation mit DEPC untersucht. Die Modifikationsmuster stimmten in beiden Transkripten überein, was nur auf ein gleiches Sekundärstrukturelement, an dessen Ausbildung die gleichen Sequenzabschnitte beteiligt sind, zurückgeführt werden kann. Das bestätigt die Ausbildung dieses *long range* Strukturelements im *in vitro* Transkript (-86/+822) und macht sein Vorkommen im Vollängentranskript sehr wahrscheinlich. Dies wird auch durch die Mg^{2+} -sensitiven Pb^{2+} -Spaltstellen des Minimalkonstrukts unterstützt, die entsprechend der vorhergesagten Struktur mit den Mg^{2+} -sensitiven Pb^{2+} -Spaltstellen in der Volllänge bzw. im Transkript (-86/+822) übereinstimmen. Die Strukturabhängigkeit der Pb^{2+} -Spaltung spricht hier ebenfalls für korrespondierende Sekundärstrukturelemente in Minimalkonstrukt und dem *in vitro* Transkript (-86/+822).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß die *psbA* mRNA in Abhängigkeit von Mg^{2+} -Ionen verschiedene sekundäre und tertiäre Wechselwirkungen ausbilden und dadurch eine kompakte, übergeordnete Struktur einnehmen kann, die gegenüber nukleolytischen Angriffen geschützt ist. Diese kompakte Struktur der *psbA* mRNA dient im reifen Chloroplasten möglicherweise als Speicherform, die gewährleistet, daß das für die Photosynthese essentielle Protein D1 jederzeit synthetisiert werden kann.

A Sequenzen

A.1 Sequenzen der Oligonukleotide

T7(-86 → -60)¹

5'-gcgccagatc ttaatacgac tcactatagg auaacauc uuucaauuuc uauuuucu-3'

T7(-15 → +8)

5'-gcgccagatc ttaatacgac tcactatagg aaccaagatt ttaccatgac tgc-3'

T7(+18 → +37)

5'-gcgccagatc ttaatacgac tcactatagg agacgcgaaa gcgaaagcc-3'

T7(+115 → +134)

5'-gcgccagatc ttaatacgac tcactatagg cctaccttat tgactgcaac-3'

T7(+962 → +984)

5'-gcgccagatc ttaatacgac tcactatagg ttaaccgtgc taaccttggc atg-3'

(-15 ← +8)

5'-gcagtcattg taaaatcttg gtt-3'

(+37 ← +18)

5'-ggctttcgct ttcgctct-3'

(+131 ← +111)

5'-gcagtcaata aggtaggat c-3'

(+210 ← +189)

5'-agatccggaa acaggttcac g-3'

(+284 ← +261)

5'-ggataaaagt gcaaccctat agct-3'

(+447 ← +423)

5'-agcggaatat gcaacagcaa tccaa-3'

(+630 ← +610)

5'-tagggagccg ccgaatacac c-3'

(+822 ← +801)

5'-gaagaagtgt aaagaacgag ag-3'

(+984 ← +962)

5'-ataccaaggt tagcacggtt aa-3'

(+1110 ← +1089)

5'-gcccctttac tttcactaac tc-3'

(+1161 ← +1138)

5'-actagtaaag gagcaataac cgat-3'

¹Bei allen mit T7 gekennzeichneten Oligonukleotiden sind 30 Nukleotide am 5'-Ende des Primers identisch und kodieren für den T7-Promotor.

A.2 Sequenz der psbA mRNA

```

-120  uugacacggg  cauauaaggc  auguuuuacu  guugaauaac  aaucuuucaa  uuucuauuuc
                                             T7(-86/-60) →
                                             +8/-15
-60  uagcgaauuu  gugugcuugg  gagucccuga  ugauuaaaau  aaauaaacca  agauuuuacc
                                             +37/+18
+1  AUGacugcaa  uuuuagagag  acgcgaaagc  gaaagccuau  ggggucgcuu  cuguauuugg
+61  auaaccagca  cugaaaaccg  ucuuuacauu  ggauugguuug  guguuuugau  gaucccuacc
+131/+111 ←
+121 uuauugacug  caacuucugu  auuuuuuaua  gccuucauug  cugcuccucc  aguagauauu
                                             +210/+189 ←
+181 gaugguauuc  gugaaccugu  uuccggaucu  cuacuuuacg  gaaauaauau  uauuucgggu
                                             +284/+261 ←
+241 gccauuauuc  cuacuucugc  agcuauaggg  uugcacuuuu  auccaaucug  ggaagcggca
                                             Pst I
+301 ucgguuuguag  agugguuaua  caaugggugu  ccuuaugaac  uaauguucu  acacuucua
+361 cuugguguag  cuuguuauau  gggucgugag  uggaacuua  guuucgucu  agguaugcgc
                                             +447/+423 ←
+421 ccuuggauug  cuguugcaua  uuccgcucca  guugcagcgg  cuacugcugu  uuucugauc
+481 uaccaaucg  gucaaggaag  cuuuucugau  gguaugccuc  uaggaaucuc  cgguacuuuc
                                             Hind III
+541 aacuuuanga  uuguauucca  ggcucacgag  acauccuua  ugcacccauu  ucacaugua
                                             +630/+610 ←
+601 gguguagcug  guguauucgg  cggcuccua  uuuagucua  ugcaugguuc  cuugguaac
+661 ucuaguuga  ucagggaac  cacagaaau  gaucugcua  augaaggua  cagauucggu
+721 caagaggaag  aaacuuaa  uaucguagcu  gcucauggu  auuuuggucg  auugaucggc
                                             +822/+801 ←
+781 caauaugcua  guucacaa  cucucguucu  uuacacucu  ucuuagcugc  uuggccuca
+841 guagguauuu  gguuuacugc  uuuagguau  aguacuaug  cuucaacu  aaugguuuc
+901 aauucaacc  aaucuguagu  ugauagucuu  ggucguguaa  uaauacuug  ggcugauac
                                             +984/+962
+961 auuaaccgug  cuaaccugg  uauggaguu  augcaugaac  gaaugcuca  uaacuccu
+1021 cuagaccuag  cugcuauuga  agcuccaucu  acaaauggau  aauuucau  uuuagcuua
Xba I +1110/+1089 ←
+1081 guguagauga  guuaguaaa  guaaaggggc  agugccgau  ucuugacuu  acaagaauc
                                             +1161/+1138 ←
+1141 gguuuugcu  ccuuuacuag  uacuaguuu  aauaguuca  guuau

```

A.3 Sequenz des Minimalkonstrukts und der verwendeten Oligonukleotide

1. Die vollständige Sequenz des Minimalkonstrukts ²

```
aauaacaauc uuucaauuuc uauuucuagc gaauuugugu gcuugggagu ccugaugau
uaaaauaaaau aaaccaagau uuuaaccauga cugcaauuuu agagagacgc gaaagcgaaa
gccaguugca gucauggguu uuuuggucga uugaucuucc aauaugcuag uuucaaca
```

2. Die Sequenzen der für das Minimalkonstrukt verwendeten Oligonukleotide

Sequenz des Oligonukleotid 1

```
aauaacaauc uuucaauuuc uauuucuagc gaauuugugu gcuugggagu ccugaugau
uaaaauaaaau aaaccaagau uuuaaccauga cugcaauuuu agagagacgc gaaagcgaaa
gcc
```

Sequenz des Oligonukleotid 2

```
aguugcaguc augguuauuu uggucgauuga ucuuccaaua ugcuaguuuc aaca
```

Sequenz des Linker-Oligonukleotid

```
accatgactg caactggctt tcgctttcgc gt
```

Sequenz des 3' PCR-Primer

```
tggtgaaact agcatattgg aat
```

²Alle Sequenzen auf dieser Seite sind in 5' → 3' Richtung angegeben

B Aufgeführte plastidäre Gene und ihre Funktion

Gen:	kodiert für:
<i>atpA</i>	α -Untereinheit des ATP-Synthase-Komplex
<i>atpB</i>	β -Untereinheit des ATP-Synthase-Komplex
<i>ndhA</i>	Untereinheit ND1 der NADH-Dehydrogenase
<i>ndhD</i>	Untereinheit der NADH-Dehydrogenase
<i>petA</i>	Cytochrom f; Bestandteil des Cytochrom b_6/f Komplex
<i>petD</i>	Untereinheit IV des Cytochrom b_6/f Komplex
<i>psaA</i>	Protein Ia des Photosystem I
<i>psaB</i>	Protein Ib des Photosystem I
<i>psaC</i>	Protein VII des Photosystem I
<i>psbA</i>	Protein D1 des Photosystem II
<i>psbB</i>	Protein CP57 des Photosystem II
<i>psbC</i>	Protein CP47 des Photosystem II
<i>psbD</i>	Protein D2 des Photosystem II
<i>psbF</i>	Cytochrom _{559/2}
<i>psbH</i>	Phosphoprotein
<i>psbL</i>	L-Protein des Photosystem II
<i>rbcL</i>	große Untereinheit der RUBISCO
<i>rpoA</i>	α -Untereinheit der im Plastid kodierten RNA-Polymerase
<i>rpoB</i>	β -Untereinheit der im Plastid kodierten RNA-Polymerase
<i>rpoC</i>	γ -Untereinheit der <i>E. coli</i> RNA-Polymerase
<i>rpoC1</i>	γ 1-Untereinheit der im Plastid kodierten RNA-Polymerase
<i>rpoC2</i>	γ 2-Untereinheit der im Plastid kodierten RNA-Polymerase
<i>rpoZ</i>	kernkodierte RNA-Polymerase
<i>rpl2</i>	Protein 2 der großen ribosomalen Untereinheit
<i>rps7</i>	Protein 7 der kleinen ribosomalen Untereinheit
<i>rps12</i>	Protein 12 der kleinen ribosomalen Untereinheit
<i>rps14</i>	Protein 14 der kleinen ribosomalen Untereinheit
<i>rps16</i>	Protein 16 der kleinen ribosomalen Untereinheit

C Organismen, deren Plastome vollständig sequenziert sind

Organismus ¹	Accession für EMBL und Genbank
<i>Adiantum capillus-veneris</i>	AY178864
<i>Amborella trichopoda</i>	AJ506156
<i>Anthoceros formosa</i>	AB086179
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AP000423
<i>Astasia longa</i>	AJ294725
<i>Atropa belladonna</i>	AJ316582
<i>Calycanthus fertilis var. ferax</i>	AJ428413
<i>Chaetosphaeridium globosum</i>	AF494278
<i>Chlorella vulgaris</i>	AB001684
<i>Cyanidium caldarium</i>	AF022186
<i>Cyanophora paradoxa</i>	U30821
<i>Eimeria tenella</i>	AY217738
<i>Epifagus virginiana</i>	M81884
<i>Euglena gracilis</i>	X70810
<i>Guillardia theta</i>	AF041468
<i>Lotus japonicus</i>	AP002983
<i>Marchantia polymorpha</i>	X04465
<i>Medicago truncatula</i>	AC093544
<i>Mesostigma viride</i>	AF166114
<i>Nephroselmis olivacea</i>	AF137379
<i>Nicotiana tabacum</i>	Z00044
<i>Odontella simensis</i>	Z67753
<i>Oenothera elata</i>	AJ271079
<i>Oryza sativa</i>	X15901
<i>Physicomitrella patens</i>	AP005672
<i>Pinus thunbergii</i>	D17510
<i>Porphyra purpurea</i>	U38804
<i>Psilotum nudum</i>	AP004638
<i>Spinacea oleracea</i>	AJ400848
<i>Toxoplasma gondii</i>	U87145
<i>Triticum aestivum</i>	AB042240
<i>Zea mais</i>	X86563

¹Stand: Oktober 2003

Literaturverzeichnis

- [1] C.C. Adams and D.B. Stern. Control of mRNA stability in chloroplasts by 3' inverted repeats: effects of stem and loop mutations on degradation of *psbA* mRNA *in vitro*. *Nucleic Acid Research*, 28:6003–6010, 1990. [1.2.3.4](#)
- [2] C. Alexander, N. Faber, and P. Klaff. Characterization of protein-binding to the spinach chloroplast *psbA* mRNA 5' untranslated region. *Nucleic Acid Research*, 26(10):2265–2272, 1998. [1.2.3.4](#), [1.4](#)
- [3] L.A. Allison. The role of sigma factors in plastid transcription. *Biochimie*, 82:537–548, 2000. [1.2.2.2](#)
- [4] L.A. Allison, L.D. Simon, and P. Maliga. Deletion of *rpoB* reveals a second distinct transcription system in plastids of higher plants. *The EMBO Journal*, 15:2802–2809, 1996. [1.2.2.1](#)
- [5] S. Baginsky, A. Shteiman-Kotler, V. Liveanu, S. Yehudai-Resheff, M. Bellaoui, R.E. Settlage, J. Shabanowitz, D.F. Hunt, G. Schuster, and W. Gruissem. Chloroplast PNPase exists as a homo-multimer enzyme complex that is distinct from the *E. coli* degradosom. *RNA*, 7:1464–1475, 2001. [1.3.1](#)
- [6] A. Barkan. Proteins encoded by a complex chloroplast transcription unit are each translated from both monocistronic and polycistronic mRNAs. *The EMBO Journal*, 7(9):2637–2644, 1988. [1.2.3.2](#)
- [7] A. Barkan. Nuclear mutants of maize with defects in chloroplast polysome assembly have altered chloroplast RNA metabolism. *Plant Cell*, 5:389–402, 1993. [1.2.3.4](#), [1.2.4](#)
- [8] T.A. Beardslee, S. Roy-Chowdhury, P. Jaiswal, L. Buhot, and S. Lerbs-Mache. A nucleus-encoded maize protein with sigma factor activity accumulates in mitochondria and chloroplasts. *The Plant Journal*, 31:199–209, 2002. [1.2.2.2](#)
- [9] J.O. Berry, D.E. Breiding, and D.F. Klessig. Light-mediated control of translational initiation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase in amaranth cotyledones. *Plant Cell*, 2:795–803, 1990. [1.2.4](#)
- [10] E. Blum, A.J. Carpousis, and C.F. Higgins. Polyadenylation promotes degradation of 3'-structured RNA by the *E. coli* mRNA degradosome. *Journal of Biological Chemistry*, 274:4009–4016, 1999. [1.3.2](#)
- [11] R. Bock. Sense from nonsense: How the genetic information of chloroplasts is altered by RNA editing. *Biochimie*, 82:549–557, 2000. [1.2.3.1](#)

- [12] R. Bock, R. Hagemann, and H. Kössel. Tissue- and stage-specific modulation of RNA editing of the *psbF* and *psbL* transcript from spinach plastids - a new regulatory mechanism. *Molecular and General Genetics*, 240:238–244, 1993. [1.2.3.1](#)
- [13] T.J. Bollenbach and D.B. Stern. Secondary structures common to chloroplast mRNA 3'-untranslated regions direct cleavage by CSP41, an endoribonuclease belonging to the short chain dehydrogenase/reductase superfamily. *Journal of Biological Chemistry*, 278:25832–25838, 2003. [1.3.1](#), [1.4](#)
- [14] P. Bonham-Smith and D. Bourque. Translation of chloroplast-encoded mRNA: potential initiation and termination signals. *Nucleic Acid Research*, 17:2057–2080, 1989. [1.2.4](#)
- [15] J.E. Boynton, N.W. Gillham, E.H. Harris, J.P. Hosler, A.M. Johnson, A.R. Jones, B.L. Randolph-Anderson, D. Robertson, T.M. Klein, K.B. Shark, and J.C. Sandford. Chloroplast transformation in *Chlamydomonas reinhardtii* with high velocity microprojectiles. *Science*, 240:1534–1538, 1988. [1.2](#)
- [16] M.M. Bradford. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72:248–254, 1976. [2.2.1.3](#)
- [17] A.D. Branch, B.J. Benenfeld, C. Paul, and H.D. Robertson. Analysis of ultra violet-induced RNA-RNA cross-links: A means for probing RNA structure-function relationships. *Methods of Enzymology*, 180:418–442, 1989. [2.3.2](#), [3.3](#)
- [18] M. Brännvall, J.C. Dewan, and A. Klug. Monitoring the structure of *E. coli* RNase P in the presence of various divalent metal ions. *Nucleic Acid Research*, 29:1426–1432, 2001. [1.5](#), [3.4.1](#)
- [19] R.S. Brown, J.C. Dewan, and A. Klug. Related crystallographic and biochemical investigation of lead(II)-catalyzed hydrolysis of yeast phenylalanine tRNA. *Nucleic Acid Research*, 29:1426–1432, 1985. [3.4.1](#), [3.10](#)
- [20] Bruick and S. Mayfield. Processing of the *psbA* 5' untranslated region in *Chlamydomonas reinhardtii* depends upon factors mediating ribosome association. *Journal of Cellular Biology*, 143:1145–1153, 1998. [1.2.3.2](#), [1.2.4](#)
- [21] S.E. Butcher, T. Dieckmann, and J. Feigon. Solution structure of a GAAA tetraloop receptor RNA. *The EMBO Journal*, 16:7490–7499, 1997. [4.1.2](#)
- [22] E.M. del Campo, B. Sabater, and M. Martin. Post-transcriptional control of chloroplast gene expression. *Journal of Biological Chemistry*, 277:36457–36464, 2002. [1.2.3.2](#)
- [23] A.J. Carpousis. The *E. coli* degradosome: structure, function and relationship to other ribonucleolytic multienzyme complexes. *Biochemical Society Transactions*, 30:150–155, 2002. [1.3](#), [1.3.1](#)
- [24] A.J. Carpousis, N.F. Vanzo, and L.C. Raynal. mRNA degradation a tale of poly(A) and multiprotein machines. *Trends in Genetics*, 15:24–28, 1999. [1.3](#), [1.3.2](#)

- [25] Y. Choquet, D.B. Stern, K. Wostrikoff, R. Kuras, J. Girad-Bascou, and F.-A. Wollman. Translation of cytochrome f is autoregulated through the 5' untranslated region of *petA* mRNA in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 95:4380–4385, 1998. 1.2.4
- [26] S. Chowdhury, C. Ragaz, E. Kreuger, and F. Narberhaus. Temperature-controlled structural alterations of an RNA thermometer. *Journal of Biological Chemistry*, 278:47915–47921, 2003. 4.2
- [27] D.A. Christopher, M. Kim, and J.E. Mullet. A novel light-regulated promoter is conserved in cereal and dicot chloroplasts. *Plant Cell*, 4:785–798, 1992. 1.2.2.3
- [28] A. Cohen, C.B. Yohn, and S.P. Mayfield. Translation of the chloroplast-encoded *psbD* mRNA is arrested post-initiation in a nuclear mutant of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Plant Physiology*, 158:1069–1075, 2001. 1.2.4
- [29] D.W. Copertino and R.B. Hallick. Group II twintron: an intron within an intron in a chloroplast cytochrome b-559 gene. *The EMBO Journal*, 10:433–442, 1991. 1.2.3.3
- [30] D.W. Copertino and R.B. Hallick. Group II and group III introns of twintrons: potential relationships with nuclear pre-mRNA introns. *Trends in Biochemical Sciences*, 18:467–471, 1993. 1.2.3.3
- [31] J.A. Cowan, editor. *The Biological Chemistry of Magnesium*. VCH, 1995. 1.5
- [32] L.D. Crossland, S.R. Rodermel, and L. Bogorad. Single gene for the large subunit of ribulosebiphosphate carboxylase in maize yields two differentially regulated mRNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 81:4060–4064, 1984. 1.2.3.2
- [33] S.C. Dahm and O.C. Uhlenbeck. Role of divalent metal ions in the hammerhead RNA cleavage reaction. *Biochemistry*, 30:9464–9469, 1991. 1.5, 3.4.1
- [34] A. Danon and S. Mayfield. ADP-dependent phosphorylation regulates RNA binding *in vitro*: implications in light-modulated translation. *The EMBO Journal*, 13:2227–2235, 1994. 1.2.4
- [35] A. Danon and S. Mayfield. Light-regulated translation of chloroplast messenger RNAs through redox potential. *Science*, 266:1717–1719, 1994. 1.2.4, 4.2.2
- [36] R. Drager, J. Girard-Bascou, Y. Choquet, K.L. Kindle, and D.B. Stern. *In vivo* evidence for 5'→3' exoribonuclease degradation of an unstable chloroplast mRNA. *The Plant Journal*, 13:645–654, 1998. 1.2.3.2, 1.2.3.4
- [37] R.G. Drager and R.B. Hallick. A complex twintron is excised as four individual introns. *Nucleic Acid Research*, 21:2389–2394, 1993. 1.2.3.3
- [38] R.G. Drager, D.C. Higgs, K.L. Kindle, and D.B. Stern. 5' to 3' exoribonucleolytic activity is a normal component of chloroplast mRNA decay pathways. *The Plant Journal*, 19(5):521–531, 1999. 1.3.1

- [39] R.G. Drager, M. Zeidler, C.L. Simpson, and D.B. Stern. A chloroplast transcript lacking the 3' inverted repeat degraded by 3'→5' exoribonuclease activity. *RNA*, 2:652–663, 1996. [1.2.3.4](#)
- [40] D. Drapier, J. Girard-Bascou, D.B. Stern, and F.-A. Wollman. A dominant nuclear mutation in *Chlamydomonas reinhardtii* identifies a factor controlling chloroplast mRNA stability by acting on the coding region of the *atpA* transcript. *The Plant Journal*, 31:687–697, 2002. [1.2.3.4](#)
- [41] S. Eberhard, D. Drapier, and F.-A. Wollman. Searching limiting steps in the expression of chloroplast-encoded proteins: relations between gene copy number, transcript abundance and translation rate in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant Journal*, 31:149–160, 2002. [1.2.1](#)
- [42] C. Eibl, Z. Zou, A. Beck, M. Kim, J. Mullet, and H.-U. Koop. *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 translation efficiency. *The Plant Journal*, 19(3):333–345, 1999. [1.2.3.4](#), [4.1.1](#)
- [43] J. Erion. Characterization of the mRNA transcripts of the maize, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase, large subunit gene. *Plant Molecular Biology*, 4:169–179, 1985. [1.2.3.2](#)
- [44] D.C. Fargo, J.E. Boynton, and N.W. Gillham. Mutations altering the predicted secondary structure of a chloroplast 5' untranslated region affects its physical and biochemical properties as well as its ability to promote translation of reporter mRNAs both in the *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast and in *E. coli*. *Molecular and Cellular Biology*, 19(10):6980–6990, 1999. [1.2.4](#)
- [45] D.C. Fargo, E. Hu, J.E. Boynton, and N.W. Gillham. Mutations that alter the higher-order structure of its 5' untranslated region affect the stability of chloroplast *rps7* mRNA. *Molecular and General Genetics*, 264:291–299, 2000. [1.2.3.4](#)
- [46] S. Felder, K. Meierhoff, A.P. Sane, J. Meurer, C. Driemel, H. Plücken, P. Klaff, B. Stein, N. Bechtold, and P. Westhoff. The nucleus-encoded HCF107 gene of Arabidopsis provides a link between intergenic RNA processing and the accumulation of translation-competent *psbH* transcripts in chloroplasts. *The Plant Cell*, 13:2127–2141, 2001. [1.2.3.2](#)
- [47] J.R. Fresco, L.C. Klotz, and E.G. Richards. New spectroscopic approach to the determination of helical secondary structure in ribonucleic acids. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 28:83–90, 1963. [3.2.2](#)
- [48] A. Gauly and H. Kössel. Evidence for tissue-specific cytosin-methylation of plastid DNA from *Zea mais*. *Current Genetics*, 15:371–376, 1989. [1.2.1](#)
- [49] W. Gruissem. Chloroplast RNA: transcription and processing. In *The biochemistry of plants*. Academic Press, San Diego, 1989. [1.2.3.2](#), [1.4](#)

-
- [50] W. Gruissem, A. Barkan, X.-W. Deng, and D.B. Stern. Transcriptional and posttranscriptional control of plastid mRNA levels in higher plants. *Trends in Genetics*, 4(9):258–263, 1988. [1.2.2](#), [1.2.3](#)
- [51] W. Gruissem and J.C. Tonkyn. Control mechanisms of plastid gene expression. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 12:19–55, 1993. [1.2](#)
- [52] L.A. Haff and L. Bogorad. Poly(adenylic acid)-containing RNA from plastids of maize. *Biochemistry*, 15:4110–4115, 1976. [1.3.2](#)
- [53] P.T.J. Hajdukiewicz, L.A. Allison, and P. Maliga. The two RNA polymerases encoded by the nuclear and the plastid compartments transcribe distinct groups of genes in tobacco plastids. *The EMBO Journal*, 16(13):4041–4048, 1997. [1.2.2.1](#)
- [54] C.R. Hauser, N.W. Gillham, and J.E. Boynton. Translational regulation of chloroplast genes. Proteins binding to the 5' untranslated regions of chloroplast mRNAs in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Biological Chemistry*, 271:1486–1497, 1996. [1.2.4](#)
- [55] R. Hayes, J. Kudla, and W. Gruissem. Degrading chloroplast mRNA: the role of polyadenylation. *Trends in Biochemical Sciences*, 24:199–202, 1999. [1.3](#)
- [56] R. Hayes, J. Kudla, G. Schuster, L. Gabay, P. Maliga, and W. Gruissem. Chloroplast mRNA 3'-end processing by a high molecular weight protein complex is regulated by nuclear-encoded RNA-binding proteins. *The EMBO Journal*, 15:1132–1141, 1996. [1.2.3.2](#), [1.3.1](#)
- [57] Chen H.C. and D.B. Stern. Specific ribonuclease activities in spinach chloroplasts promote mRNA maturation and degradation. *Journal of Biological Chemistry*, 266:24205–24211, 1991. [1.2.3.4](#)
- [58] R. Hecker, Z. Wang, G. Steger, and D. Riesner. Analysis of RNA structures by temperature-gradient gel electrophoresis: Viroid replication and processing. *Gene*, 72:59–74, 1988. [3.2.2](#), [3.5.2.2](#)
- [59] K.O.F. Hedenstierna, J.L. Siefert, G.E. Fox, and E.J. Murgola. Co-conservation of rRNA tetraloop sequences and helix length suggests involvement of the tetraloops in higher-order interactions. *Biochimie*, 82:221–227, 2000. [4.1.2](#)
- [60] K. Henco, G. Steger, and D. Riesner. Melting curves on less than 1 µg nucleic acid. *Analytical Biochemistry*, 101, 1980. [2.3.3](#)
- [61] W.R. Hess and T. Börner. Organellar RNA Polymerases of Higher Plants. *International Review of Cytology*, 190:1–59, 1999. [1.2.2.1](#), [1.2.2.3](#)
- [62] D.C. Higgs, R.S. Shapiro, K.L. Kindle, and D.B. Stern. Small *cis*-acting sequences that specify secondary structures in a chloroplast mRNA are essential for RNA stability and translation. *Molecular and Cellular Biology*, 19(12):8479–8491, 1999. [1.2.3.4](#), [1.2.4](#), [1.3.4](#)

- [63] T. Hirose and M. Sugiura. Both RNA editing and RNA cleavage are required for translation of tobacco chloroplast *ndhD* RNA: a possible regulatory mechanism for the expression of a chloroplast operon consisting of functionally unrelated genes. *The EMBO Journal*, 16(22):6804–6811, 1997. 1.2.4
- [64] T. Hirose and M. Sugiura. *Cis*-acting elements and *trans*-acting factors for accurate translation of chloroplast *psbA* mRNA: development of an *in vitro* translation system. *The EMBO Journal*, 15:1687–1695, 1996. 1.2.4
- [65] B. Hoch, R.M. Maier, K. Appel, G.L. Igloi, and H. Kössel. Editing of a chloroplast mRNA by creation of an initiation codon. *Nature*, 353:178–180, 1991. 1.2.3.1
- [66] M. Horlitz. *mRNA Abbau in Chloroplasten höherer Pflanzen: Mechanismus und Kontrolle*. Dissertation, Heinrich-Heine Universität, Düsseldorf, 2000. 1.3.4, 1.4, 1.4, 3.1.1, 3.1.1, 4.1.1, 4.1.2, 4.1, 4.1.2, 4.1.3, 4.2.1
- [67] M. Horlitz and P. Klaff. Magnesium-gene-specific *trans*-regulatory functions for chloroplast mRNA stability in higher plants. *Journal of Biological Chemistry*, 275:35638–35645, 2000. 1.3.4, 1.3, 1.4, 1.6, 3, 3.1, 4, 4.2.1, 5
- [68] Y. Ikawa, D. Naito, N. Aono, H. Shiraishi, and T. Inoue. A conserved motif in group IC3 introns is a new class of GNRA tetraloop receptor. *Nucleic Acid Research*, 27:1859–1865, 1999. 4.1.2
- [69] Y. Ikawa, K. Nohmi, S. Atsumi, H. Shiraishi, and T. Inoue. A comparative study on two GNRA tetraloop receptors: 11-nt and IC3 motifs. *Journal of Biochemistry*, 130:251–255, 2001. 4.1.2
- [70] L. Jaeger, F. Michel, and E. Westhof. Involvement of a GNRA tetraloop in long-range RNA tertiary interactions. *Journal of Molecular Biology*, 236:1271–1276, 1994. 4.1.2
- [71] R. Kaempfer. RNA sensors: novel regulators of gene expression. *The EMBO reports*, 4:1043–1047, 2003. 4.2
- [72] S. Kapoor, J.Y. Suzuki, and M. Sugiura. Identification and functional significance of a new class of non-consensus-type plastid promoters. *The Plant Journal*, 11:327–337, 1997. 1.2.2.3
- [73] J. Kim and J. Mullet. Ribosome-binding sites on chloroplast *rbcL* and *psbA* mRNAs and light-induced initiation of D1 translation. *Plant Molecular Journal*, 25:437–448, 1994. 1.2.4
- [74] M. Kim, D. Christopher, and J. Mullet. Direct evidence for selective modulation of *psbA*, *rpoA*, *rbcL* and 16S-rRNA RNA stability during barley chloroplast development. *Plant Molecular Biology*, 22:447–463, 1993. 1.2.3.4, 1.4
- [75] P. Klaff. mRNA decay in spinach chloroplasts: *psbA* mRNA degradation is initiated by endonucleolytic cleavages within the coding region. *Nucleic Acid Research*, 23(23):4885–4892, 1995. 1.3.4, 1.4, 3.1.2, 3.4.3, 4.1.1

- [76] P. Klaff. *Regulation der mRNA-Stabilität in Chloroplasten höherer Pflanzen: Bedeutung der RNA-Struktur und RNA-bindender Proteine*. Habilitationsschrift, Heinrich-Heine Universität, Düsseldorf, Oktober 1997. [1.4](#)
- [77] P. Klaff and W. Gruissem. Changes in chloroplast mRNA stability during leaf development. *Plant Cell*, 3:517–529, 1991. [1.2.3.4](#), [1.4](#), [1.6](#), [4.2.2](#)
- [78] P. Klaff and W. Gruissem. Identification of a 43 kD light-regulated chloroplast RNA-binding protein that interacts with the *psbA* 5' untranslated leader RNA. *Photosynthetic Research*, 46:235–248, 1995. [1.3.4](#)
- [79] P. Klaff, S.M. Mundt, and G. Steger. Complex formation of the spinach chloroplast *psbA* 5'untranslated region with proteins is dependent on the RNA structure. *RNA*, 3:1468–1479, 1997. [1.3.4](#), [1.4](#), [2.3.4](#), [4.1.1](#)
- [80] Y. Komine, L. Kwong, M.C. Anguera, G. Schuster, and D.B. Stern. Polyadenylation of three classes of chloroplast RNA in *Chlamydomonas reinhardtii*. *RNA*, 6:598–607, 2000. [1.3.2](#)
- [81] J.S. Koo and L.L. Spremulli. Analysis of the translational initiation region on the *Euglena gracilis* chloroplast ribulose biphosphate carboxylase-oxygenase *rbcL* messenger RNA. *Journal of Biological Chemistry*, 269:7494–7500, 1994. [1.2.4](#)
- [82] K. Krause, R.M. Maier, W. Kofler, K. Krupinska, and R.G. Herrmann. Disruption of plastid-encoded RNA polymerase genes in tobacco: expression of only a distinct set of genes is not based on selective transcription of the plastid chromosome. *Molecular and General Genetics*, 263:1022–1030, 2000. [1.2.2.1](#), [1.2.2.3](#)
- [83] J. Kudla and R. Bock. RNA editing in an untranslated region of the ginkgo chloroplast genome. *Gene*, 234:81–86, 1999. [1.2.3.1](#)
- [84] J. Kudla, R. Hayes, and W. Gruissem. Polyadenylation accelerates degradation of chloroplast mRNA. *The EMBO Journal*, 15:7137–7146, 1996. [1.3.2](#)
- [85] J. Kudla, G.L. Igloi, M. Metzlauff, R. Hagemann, and H. Kössel. RNA editing in tobacco chloroplasts leads to the formation of a translatable *psbL* mRNA by a C to U substitution within the initiation codon. *The EMBO Journal*, 11:1099–1103, 1992. [1.2.3.1](#)
- [86] S. Kuhlmann. *Struktur chloroplastenkodierter mRNAs und ihre Wechselwirkung mit Proteinen*. Diplomarbeit, Heinrich-Heine Universität, Düsseldorf, 1999. [2.3.4](#)
- [87] R. Kuras, S. Buschlen, and F.-A. Wollman. Maturation of pre-apocytochrome f *in vivo*. A site-directed mutagenesis study in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Biological Chemistry*, 270:27797–27803, 1995. [1.2.4](#)
- [88] R. Kuras, F.-A. Wollman, and P. Joliot. Conversion of cytochrome f to a soluble form *in vivo* in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochemistry*, 34:7468–7475, 1995. [1.2.4](#)
- [89] D. Labuda and D. Porschke. Magnesium ion inner sphere complex in the anticodon loop of tRNA^{Phe}. *Biochemistry*, 21:49–53, 1982. [1.5](#)

- [90] H. Lee, S.E. Bingham, and A.N. Webber. Function of the 3' noncoding sequences and stop codon usage in expression of the chloroplast *psaB* gene in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochemical and Biophysical Acta*, 1049:337–364, 1996. [1.2.3.4](#)
- [91] S. Lerbs-Mache. The 110 kDa polypeptide of spinach plastid DNA-dependent RNA polymerase: single-subunit enzyme or catalytic core of multimeric enzyme complexes? *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 90:5509–5513, 1993. [1.2.2.1](#)
- [92] M. Lindell, P. Romby, and E.G. Wagner. Lead(II) as a probe for investigating RNA structure in vivo. *RNA*, 8:534–541, 2002. [2.3.5.2](#), [3.4.3](#)
- [93] I. Lisitsky, P. Klaff, and G. Schuster. Addition of poly(A)-rich sequences to endonucleolytic cleavage sites in the degradation of spinach chloroplast mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 93:13398–13403, 1996. [1.3.2](#), [1.4](#)
- [94] I. Lisitsky, P. Klaff, and G. Schuster. Blocking polyadenylation of mRNA in the chloroplast inhibits its degradation. *The Plant Journal*, 12:1173–1178, 1997. [1.3.2](#), [1.4](#)
- [95] I. Lisitsky, P. Klaff, and G. Schuster. The mechanism of preferential degradation of polyadenylated RNA in the chloroplast: the exoribonuclease 100 RNP/PNPase displays high binding affinity for poly(A) sequence. *Journal of Biological Chemistry*, 272:17648–17653, 1997. [1.3.1](#), [1.4](#)
- [96] M. Maderia, T.E. Horton, and V.J. DeRose. Metal interactions with a GAAA RNA tetraloop characterized by ³¹P NMR and phosphorothioate substitutions. *Biochemistry*, 39:8193–8200, 2000. [3.4.2](#), [4.1.2](#)
- [97] R.M. Maier, B. Hoch, P. Zeltz, and H. Kössel. Internal editing of the maize chloroplast *ndhA* transcript restores codons for conserved amino acids. *Plant Cell*, 4:609–616, 1992. [1.2.3.1](#)
- [98] R.M. Maier, P. Zeltz, H. Kössel, G. Bonnard, J.M. Gualberto, and J.-M. Grienenberger. RNA editing in plant mitochondria and chloroplasts. *Plant Molecular Biology*, 32:343–365, 1996. [1.2.3.1](#)
- [99] M. Matysiak, J. Wresinski, and J. Ciesiolka. Sequential folding of Genomic Ribozyme of the Hepatitis Delta Virus: Structural Analysis of RNA Transcription Intermediates. *Journal of Molecular Biology*, 291:283–294, 1999. [1.5](#), [2.3.5.1](#), [3.4.1](#)
- [100] S. Mayfield, A. Cohen, A. Danon, and C. Yohn. Translation of the *psbA* mRNA of *Chlamydomonas reinhardtii* requires a structured element within the 5' untranslated region. *Journal of Cell Biology*, 127:1537–1545, 1994. [1.2.3.4](#)
- [101] S.P. Mayfield, C.B. Yohn, A. Cohen, and A. Danon. Regulation of chloroplast gene expression. *Annual Review in Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 46:147–166, 1995. [1.2](#), [1.2.2](#), [1.2.2.3](#), [1.2.3](#), [1.2.3.3](#), [1.2.3.4](#), [1.2.4](#)
- [102] O. Melefors, U. Lundberg, and v. Gabain, A. RNA processing and degradation by RNase K and RNase E. In G. Brawerman and J. Belasco, editors, *Control of mRNA stability*, pages 53–70. New York Academic Press, 1993. [3.1.2](#), [4.1.1](#)

- [103] A. Melis. Photosystem II damage and repair cycle in chloroplasts: what modulates the rate of photodamage. *Trends in Plant Science*, 4:130–135, 1999. 1.4
- [104] E.-I. Minami, K. Shinohara, N. Kawakami, and Watanabe A. Localization and properties of transcripts of *psbA* and *rbcL* genes in the stroma of spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiology*, 29:1303–1309, 1988. 1.2.4
- [105] V.K. Misra and D.E. Draper. On the Role of Magnesium Ions in RNA Stability. *Biopolymers*, 48:113–135, 1998. 1.5, 4.2, 4.2.1
- [106] V.K. Misra and D.E. Draper. The interpretation of Mg^{2+} binding isotherms for nucleic acids using Poisson-Boltzmann theory. *Journal of Molecular Biology*, 294:1135–1147, 1999. 1.5
- [107] V.K. Misra, R. Shiman, and D.E. Draper. A thermodynamic framework for the Magnesium-dependent folding of RNA. *Biopolymers*, 69:118–136, 2002. 4.2, 4.2.1
- [108] B.K. Mohanty and S.R. Kushner. Polynucleotide phosphorylase functions both as 3' to 5' exonuclease and a poly(A) polymerase in *E. coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 97:11966–11971, 2000. 1.3.2
- [109] R.-A. Monde, F. Zito, J. Olive, F.-A. Wollman, and D.B. Stern. Post-transcriptional defects in tobacco chloroplast mutants lacking the cytochrome b_6/f complex. *The Plant Journal*, 21(1):61–72, 2000. 1.2.4
- [110] R.A. Monde, G. Schuster, and D.B. Stern. Processing and degradation of chloroplast mRNA. *Biochimie*, 82:573–582, 2000. 1.2.3, 1.2.3.3, 1.2.3.4, 1.3
- [111] S.M. Mundt. *Modellbildung zur Korrelation zwischen Struktur und Gelmobilität von einzelsträngiger RNA*. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, 1993. 2.3.4
- [112] H. Neuhaus and G. Link. The chloroplast tRNA^{Lys} (UUU) gene from mustard (*Sinapis alba*) contains a class II intron potentially coding for a maturase-related polypeptide. *Current Genetics*, 11:251–257, 1987. 1.2.3.3
- [113] H. Neuhaus, T. Pfannschmidt, and G. Link. Nucleotide sequence of the chloroplast *psbI* and *trnS-GCU* genes from mustard *Sinapis alba*. *Nucleic Acid Research*, 18:368, 1990. 1.2.2.3
- [114] J. Nickelsen. Transcripts containing the 5' untranslated regions of the plastid genes *psbA* and *psbB* from higher plants are unstable in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts. *Molecular and General Genetics*, 262:768–771, 1999. 1.2.3.4
- [115] J. Nickelsen, M. Fleischmann, E. Boudreau, M. Rahire, and J.D. Rochaix. Identification of *cis*-acting RNA leader elements required for chloroplast *psbD* gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell*, 11:957–970, 1999. 1.2.3.2, 1.2.3.4, 1.3.4
- [116] J. Nickelsen and G. Link. Nucleotide sequence of the mustard chloroplast genes *trnH* and *rps19*. *Nucleic Acid Research*, 18:1051, 1990. 1.2.2.3

- [117] J. Nickelsen, J. van Dillewijn, M. Rahire, and J.D. Rochaix. Determinants of stability of the chloroplast *psbD* RNA located within its short leader region in *Chlamydomonas reinhardtii*. *The EMBO Journal*, 13:3182–3191, 1994. [1.2.3.4](#), [1.3.4](#)
- [118] E. Nudler and A.S. Mironov. The riboswitch control of bacterial metabolism. *Trends in Biochemical Sciences*, 29:11–17, 2004. [1.5](#), [4.2](#)
- [119] T. Parthen. *Strukturvarianten chloroplastenkodierter mRNAs und ihr Effekt auf Proteinbindung*. Diplomarbeit, Heinrich-Heine Universität, Düsseldorf, 2000. [4.1.1](#)
- [120] N. Polacek and A. Barta. Metal ion probing of rRNAs: evidence for evolutionarily conserved divalent cation binding pockets. *RNA*, 4:1282–1294, 1998. [1.5](#), [3.4.1](#)
- [121] A.M. Pyle. Metal ions in the structure and function of RNA. *Journal of Inorganic Chemistry*, 7:679–690, 2002. [1.5](#), [4.2](#), [4.2.1](#)
- [122] QIAGEN. *QIAquick Spin Handbook*, März 2001. [2.2.2.1](#), [2.2.3.1](#)
- [123] R. Ramos and E. Martinez-Salas. Long-range RNA interactions between structural domains of the aphthovirus internal ribosomal entry site (IRES). *RNA*, 5:1374–1383, 1999. [4.1.2](#)
- [124] P. Regnier and C.M. Arraiano. Degradation of mRNA in bacteria: emergence of ubiquitous features. *BioEssays*, 22:235–244, 2000. [1.3](#)
- [125] S. Reinbothe, C. Reinbothe, C. Heintzen, C. Seidenbecher, and B. Parthier. A methyl jasmonate-induced shift in the length of the 5' untranslated region impairs translation of the plastid *rbcL* transcript in barley. *The EMBO Journal*, 12:1505–1512, 1993. [1.2.3.2](#)
- [126] D. Riesner, K. Henco, and G. Steger. Temperature gradient gel electrophoresis: a method for the analysis of conformational transitions and mutations in nucleic acids and proteins. In A. Chrambach, M.J. Dunn, and B.J. Radola, editors, *Advances in electrophoresis*. VCH Weinheim, 1991. [2.3.4](#)
- [127] J.-D. Rochaix, M. Goldschmidt-Clermont, and S. Merchant, editors. *The Molecular Biology of Chloroplasts and Mitochondria in Chlamydomonas*. Kluwer Academic Publishers, 1998. [1.2.3](#), [1.2.3.3](#), [1.2.4](#)
- [128] V. Rosenbaum and D. Riesner. Temperature-gradient gel electrophoresis: Thermodynamic analysis of nucleic acids and proteins in purified form and in cellular extracts. *Biophys Chem*, 26:235–246, 1987. [2.3.1.3](#)
- [129] R. Rott, H. Levy, R. Drager, D. Stern, and G. Schuster. 3'-processed mRNA is preferentially translated in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts. *Molecular and Cellular Biology*, 18:4605–4611, 1998. [1.2.4](#)
- [130] R. Rott, V. Liveanu, R.G. Drager, D.B. Stern, and G. Schuster. The sequence and structure of the 3'-untranslated regions of chloroplast transcript are important determinants of mRNA accumulation and stability. *Plant Molecular Journal*, 36:307–314, 1998. [1.2.3.4](#)

- [131] S. Rudisser and J.R. Tinoco. Solution structure of Cobalt(III)hexamine complex to the GAAA tetraloop, and metal-ion binding to G:A mismatches. *Journal of Molecular Biology*, 295:1211–1223, 2000. [3.4.2](#), [4.1.2](#)
- [132] M. Ruf and H. Kössel. Occurrence and spacing of ribosome recognition sites in mRNAs of chloroplasts from higher plants. *FEBS Letters*, 240:41–44, 1988. [1.2.4](#)
- [133] W. Sakamoto, X. Chen, K.L. Kindle, and D.B. Stern. Function of the *Chlamydomonas reinhardtii* *petD* 5' untranslated region in regulating the accumulation of subunit IV of the cytochrome b_6/f complex. *The Plant Journal*, 6:503–512, 1994. [1.2.3.4](#)
- [134] N. Sakar. Polyadenylation of mRNA in prokaryotes. *Biochemistry*, 66:173–197, 1997. [1.3.2](#)
- [135] J. Sambrook, E.F. Fritsch, and T. Maniatis. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. [2.2.2.6](#)
- [136] F. Sanger, S. Nicklen, and A.R. Coulson. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 74:5463–5467, 1977. [2.4.1](#)
- [137] J.E. Schaak, H. Yakhin, P.C. Bevilacqua, and P. Babitzke. A Mg^{2+} -dependent RNA tertiary structure forms in the *Bacillus subtilis* *trp* operon leader transcript and appears to interfere with *trpE* translation control by inhibiting TRAP binding. *Journal of Molecular Biology*, 332:555–574, 2003. [4.2](#), [4.2.1](#)
- [138] M. Schmitz and G. Steger. Base-pair probability profiles of RNA secondary structure. *Computational Applications in Biological Sciences*, 8:389–399, 1992. [2.3.4](#), [2](#), [3.5.1](#)
- [139] C. Schmitz-Linneweber, M. Tillich, R.G. Herrmann, and R.M. Maier. Heterologous, splicing-dependent RNA editing in chloroplasts: allotetraploidy provides *trans*-factors. *The EMBO Journal*, 20:4874–4883, 2001. [1.2.3.1](#)
- [140] J. Schuhmacher, J. Randels, and D. Riesner. A two-dimensional electrophoretic technique of the detection of circular viroids and virusoids. *Analytical Biochemistry*, 135:288–295, 1983. [2.3.1.5](#)
- [141] G. Schuster, I. Lisitsky, and P. Klaff. Polyadenylation and degradation of mRNA in the chloroplast. *Plant Physiology*, 120:937–944, 1999. [1.3](#)
- [142] Lahiri S.D. and L.A. Allison. Complementary expression of two plastid-localized sigma-like factors in maize. *Plant Physiology*, 123:883–894, 2000. [1.2.2.2](#)
- [143] S. Sensken. *Wechselwirkung zweiwertiger Kationen mit chloroplastenkodierten mRNAs*. Diplomarbeit, Heinrich-Heine Universität, Düsseldorf, 2001. [1.6](#), [3](#), [3.1.2](#), [3.3](#), [3.4.2](#), [3.4.3](#), [3.23](#), [3.5.3.2](#), [4.1.1](#), [4.1.2](#), [4.1.3](#), [5](#)
- [144] G. Serino and P. Maliga. RNA polymerase subunits encoded by the plastid *rpo* genes are not shared with the nucleus-encoded plastid enzyme. *Plant Physiology*, 117:1165–1170, 1998. [1.2.2.1](#)

- [145] T.B. Sexton, D.A. Christopher, and J.E. Mullet. Light-induced switch in barley *psbD-psbC* promotor utilization: a novel mechanism regulating chloroplast gene expression. *The EMBO Journal*, 9:4485–4494, 1990. [1.2.2.3](#)
- [146] T. Shiina, L. Allison, and Maliga P. *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, 1998. [1.2.3.4](#)
- [147] B. Sohlberg, U. Lundberg, F.U. Hartl, and A. Gabain. Functional interaction of heat shock protein GroEL with an RNase E-like activity in *E. coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 90:277–281, 1993. [1.3.1](#)
- [148] G. Steger. *Strukturumwandlungen von Viroiden, Virusoiden und Satelliten-Ribonukleinsäuren in Theorie und Experiment*. Dissertation, Technische Hochschule Darmstadt, 1983. [2.3.3](#)
- [149] G. Steger, H. Hoffmann, F. Förtsch, H.J. Gross, J.W. Randles, H.L. Sängler, and D. Riesner. Conformational transitions in viroids and virusoids: comparison of results from energy minimization algorithm and from experimental data. *Journal of Biomolecular and Structural Dynamics*, 2:543–571, 1984. [2.3.4](#), [3.2.2](#), [3.5.1](#), [3.5.2.2](#)
- [150] D.B. Stern and W. Gruissem. Control of plastid gene expression: 3' inverted repeats act as mRNA processing and stabilization elements, but do not terminate transcription. *Cell*, 51:1145–1157, 1987. [1.2.2.4](#), [1.2.3.2](#), [1.2.3.4](#), [4.3](#)
- [151] D.B. Stern, D.C. Higgs, and J. Yang. Transcription and translation in chloroplasts. *Trends in Plant Science*, 2(8):308–315, 1997. [1.2](#), [1.2.2](#), [1.2.3](#), [1.2.4](#)
- [152] D.B. Stern, H. Jones, and W. Gruissem. Function of plastid mRNA 3' inverted repeats. RNA stabilization and gene-specific protein binding. *Journal of Biological Chemistry*, 264:18742–18750, 1989. [1.2.3.2](#), [1.2.3.4](#)
- [153] D.B. Stern and K.L. Kindl. 3' end maturation of the *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast *atpB* mRNA is a two-step process. *Molecular and Cellular Biology*, 13:2277–2285, 1993. [1.2.3.2](#)
- [154] D.B. Stern, E.R. Radwanski, and K.L. Kindle. A 3' stem/loop structure of the *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast *atpB* gene regulates mRNA accumulation *in vivo*. *Plant Cell*, 3:285–297, 1991. [1.2.3.4](#)
- [155] J.K. Stevenson and R.B. Hallick. The *psaA* operon pre-mRNA of the *Euglena gracilis* chloroplast is processed into photosystem I and II mRNAs that accumulate differentially depending on the conditions of cell growth. *The Plant Journal*, 5:247–260, 1994. [1.2.3.2](#)
- [156] B. Streicher, E. Westhof, and R. Schroeder. The environment of two metal ions surrounding the splice site of a group I intron. *The EMBO Journal*, 15:2556–2564, 1996. [1.5](#), [3.4.1](#)

- [157] M. Sugita, K. Shinozaki, and M. Sugiura. Tobacco chloroplast tRNA^{Lys} (UUU) gene contains a 2.5-kilobasepair intron: an open reading frame and a conserved boundary sequence in the intron. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 82:3557–3561, 1985. [1.2.3.3](#)
- [158] M. Sugita and M. Sugiura. Regulation of gene expression in chloroplasts of higher plants. *Plant Molecular Biology*, 32:315–326, 1996. [1.2](#), [1.2.3](#), [1.2.3.3](#), [1.2.3.4](#)
- [159] M. Sugiura. The chloroplast genome. *Plant Molecular Journal*, 19:149–168, 1992. [1.2.1](#)
- [160] M. Sugiura, T. Hirose, and M. Sugita. Evolution and Mechanism of Translation in Chloroplasts. *Annual Reviews in Genetics*, 32:437–459, 1998. [1.2.4](#)
- [161] Z. Svab and P. Maliga. High-frequency plastid transformation in tobacco by selection for a chimeric *aadA* gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 90:913–917, 1993. [1.2](#)
- [162] R.J. Thompson and G. Mosig. Light affects the structure of *chlamydomonas* chloroplast chromosomes. *Nucleic Acid Research*, 18:2625–2631, 1990. [1.2.1](#)
- [163] K. Tiller and G. Link. Phosphorylation and dephosphorylation affect functional characteristics of chloroplast and etioplast transcription systems from mustard *Sinapis alba* L. *The EMBO Journal*, 12:1745–1753, 1993. [1.2.2.2](#)
- [164] K. Tiller and G. Link. Sigma-like transcription factors from mustard (*Sinapis alba* L.) etioplasts are similar in size to, but functionally distinct from, their chloroplast counterparts. *Plant Molecular Biology*, 21:503–513, 1993. [1.2.2.2](#)
- [165] T. Trebitsh, A. Levitan, A. Sofer, and A. Danon. Translation of chloroplast *psbA* mRNA is modulated in the light by counteracting oxidizing and reducing activities. *Molecular and Cellular Biology*, 20(4):1116–1123, 2000. [1.2.4](#)
- [166] F.E. Vaistij, M. Goldschmidt-Clermont, K. Wostrikoff, and J.D. Rochaix. Stability determinants in the chloroplast *psbB/T/H* mRNAs of *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant Journal*, 21:469–482, 2000. [1.2.3.4](#)
- [167] A.G. Vitreschak, D.A. Rodionov, A.S. Mironov, and M.S. Gelfand. Riboswitches: the oldest mechanism for the regulation of gene expression? *Trends in Genetics*, 20:44–50, 2004. [1.5](#), [4.2](#)
- [168] M. Walter, J. Kilian, and J. Kudla. PNPase activity determines the efficiency of mRNA 3'-end processing, the degradation of tRNA and the extend of polyadenylation in chloroplasts. *The EMBO Journal*, 21:6905–6914, 2002. [1.3.2](#)
- [169] W. Whale and W. Keller. The biochemistry of polyadenylation. *Trends in Biochemical Science*, 21:247–250, 1996. [1.3.2](#)
- [170] D. Winter, N. Polacek, I. Halama, B. Streicher, and A. Barta. Lead-catalysed specific cleavage of ribosomal RNAs. *Nucleic Acid Research*, 25:1817–1824, 1997. [1.5](#), [3.4.1](#)

- [171] J.R. Wyatt, J.D. Puglisi, and I. Jr. Tinoco. RNA pseudoknots - stability and loop size requirements. *Journal of Molecular Biology*, 214:455–470, 1990. [2.3.6](#)
- [172] J. Yang and D.B. Stern. The spinach chloroplast endoribonuclease CSP41 cleaves the 3' untranslated region of *petD* mRNA primarily within its terminal stem-loop structure. *Journal of Biological Chemistry*, 272:12784–12880, 1997. [1.3.1](#), [1.4](#)
- [173] S. Yehudai-Resheff, M. Hirsh, and G. Schuster. Polynucleotide phosphorylase functions as both an exonuclease and a poly (A) polymerase in spinach chloroplasts. *Molecular and Cellular Biology*, 21:5408–5416, 2001. [1.3.2](#)
- [174] B.T. Young and S.K. Silverman. The GAAA Tetraloop-Receptor interaction contributes differentially to folding thermodynamics and kinetics for the P4-P6 RNA domain. *Biochemistry*, 41:12271–12276, 2002. [4.1.2](#), [4.2.1](#)
- [175] W. Zerges. Translation in chloroplasts. *Biochimie*, 82:583–601, 2000. [1.2.4](#)
- [176] G. Zurawski, H.J. Bohnert, and W. Whitfield, P.R. Bottomly. Nucleotide sequence of the gene for the M_r 32000 thylakoid membrane protein from *Spinacea oleracea* and *Nicotiana tabacum debeyi* predicts a totally conserved primary translation product of M_r 38950. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 79:7699–7703, 1982. [1.4](#), [2.1.2.2](#), [2.2.2.1](#), [1](#), [3](#), [3.11](#), [3.13](#), [3.15](#), [3.17](#), [3.19](#), [3.20](#)

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß ich meine Dissertation selbstständig verfaßt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt sowie Zitate kenntlich gemacht habe.

Düsseldorf, den