

**Molekularbiologische, physiologische und biochemische
Untersuchungen zur Funktion des HCF136-Proteins bei der
Biogenese des Photosystems II in höheren Pflanzen**

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

**vorgelegt von
Henning Plücker
aus Mönchengladbach
2000**

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

1. Berichterstatter: Prof. Dr. P. Westhoff

2. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Martin

Tag der mündlichen Prüfung: 14.12.2000

Abkürzungen

APG	p-Azidophenylglyoxal
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BAM	Benzamidin
BSA	Rinderserumalbumin
bp	Basenpaare
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Chl	Chlorophyll
Ci	Curie
Cytb ₆	Cytochrom b ₆
Cyt b ₆ f	Cytochrom b ₆ f-Komplex
Cytf	Cytochrom f
DM	n-Dodecyl-β-D-maltosid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
DTSSP	Dithiobis(sulfosuccinimidylpropionat)
DTT	Dithiothreitol
ECL	enhanced chemo luminescence
EDC	1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EGTA	1,2-Bis-2(aminoethoxyethan)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
FNR	Ferredoxin-NADP-Oxidoreduktase
g	Erdbeschleunigung
GGPP	Geranylgeraniol-Pyrophosphat
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
hcf	Hochchlorophyllfluoreszenz
<i>hcf</i>	Bezeichnung der Mutante
<i>HCF</i>	Bezeichnung des Gens
HCF	Bezeichnung des Genprodukts
HEPES	n-2-Hydroxyethyl-piperazin-n-2-ethansulfonsäure
HPLC	high performance liquid chromatography
J	Joule
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
Ler	<i>Landsberg erecta</i>

Abkürzungen

LHC	Lichtsammelkomplex
LSU/SSU	große / kleine Untereinheit der Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase
M	Molar, mol/l
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure
min	Minute
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
NADPH/H ⁺	Nicotinamid-Adenosin-Dinukleotid-Phosphat
OD	optische Dichte
P680	Chlorophyll a des Reaktionszentrums II
P700	Chlorophyll a des Reaktionszentrums I
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PC	Plastocyanin
Pheo	Phäophytin
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PQ/PQH ₂	oxidiertes / reduziertes Plastochinon
PS I	Photosystem I
PS II	Photosystem II
PVDF	Polyvinylidendifluoride
Q _A	primärer Chinon-Elektronenakzeptor des PS II
Q _B	sekundärer Chinon-Elektronenakzeptor des PS II
RC II	Reaktionszentrum vom Photosystem II
RNA	Ribonukleinsäure
RubisCO	Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase
RT	Raumtemperatur
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
Sulfo-NHS	N-Hydroxysulfosuccinimid
TCA	Trichloressigsäure
T-DNA	Transfer-DNA
Tris	N-Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Enzymeinheit
rpm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
V	Volt
w/v	Gewicht pro Volumen

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Struktur und Funktion der Chloroplasten	1
1.2	Ursprung und Evolution der Plastiden	2
1.3	Struktur und Funktion des Photosystems II	3
1.4	Biogenese des Photosystems II	5
1.4.1	Die primären Schritte	5
1.4.2	Die Assemblierung des Photosystems II	6
1.5	Die Photosynthesemutante <i>hcf136</i> von <i>Arabidopsis thaliana</i>	11
1.6	Ziele dieser Arbeit	12
2	MATERIAL UND METHODEN	13
2.1	Material	13
2.1.1	Chemikalien	13
2.1.2	Enzyme	13
2.1.3	Bakterien- und Hefestämme	13
2.1.4	Plasmide	13
2.1.4	Verwendete Oligonukleotide	13
2.1.5	Antiseren	15
2.1.6	Saatgut	15
2.2.	Pflanzenanzucht	16
2.2.1	Sterile Anzucht von <i>Arabidopsis</i> -Keimlingen auf MS-Medium	16
2.2.2	Etiolierung von <i>Arabidopsis</i> -Keimlingen	16
2.2.3	Anzucht von <i>Arabidopsis thaliana</i> auf Erde	16
2.2.4	Anzucht von Spinat im Gewächshaus	16
2.2.5	Etiolierung von Spinat und Gerste	17
2.2.6	Anzucht von grüner Gerste in der Anzuchtkammer	17
2.3	Molekularbiologische Methoden	17
2.3.1	Amplifizierung von DNA mit der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	17
2.3.2	Klonierung von DNA-Fragmenten	17
2.3.3	Herstellung und Anzucht von rekombinanten <i>E. coli</i> DH5 α -Klonen	18
2.3.4	Plasmidisolierung	18
2.3.5	Mutagenese von <i>Synechocystis spec.</i> PCC6803	18
2.3.5.1	Herstellung von Deletionskonstrukten der <i>tatA</i> und <i>tatB</i> -Gene von <i>Synechocystis spec.</i> PCC6803	18
2.3.5.2	Transformation von <i>Synechocystis spec.</i> PCC6803	18

2.3.6	Gerichtete Mutagenese zur Herstellung eines durchgehenden psbE/F-Leserasters	19
2.3.7	Komplementation der Mutante <i>hcf136</i> über Wurzeltransformation	19
2.3.8	Suche nach Interaktionspartnern von HCF136 mit Hilfe des Zwei-Hybrid-Systems der Hefe	20
2.3.8.1	Sichtung einer <i>Arabidopsis thaliana</i> cDNA-Bank	21
2.3.8.2	Herstellung einer Plastidenbank für das Zwei-Hybrid-System und anschließende Sichtung mit HCF136 als Köderprotein	21
2.3.8.3	Untersuchungen auf direkte Interaktion	22
2.3.9	Computerunterstützte Sequenzanalysen	23
2.4.	Pflanzenphysiologische Methoden	24
2.4.1	Chlorophyll-Fluoreszenz-Induktionsmessungen	24
2.4.1.1	Vergleichende Messungen Wildtyp-Mutante	24
2.4.1.2	Chlorophyll-Fluoreszenzmessung bei 1.200 μ E aktinischem Licht	24
2.4.1.3	Chlorophyll-Fluoreszenzmessung von Keimlingen, die zuvor bei 2.000 μ E lichtgestresst worden sind	24
2.4.2	Chlorophyll-Fluoreszenzuntersuchungen mit dem FluorCam-System	25
2.4.3	HPLC-Auftrennung photosynthetischer Pigmente	25
2.5	Proteinbiochemische Methoden	26
2.5.1	Isolation von Gesamt-Membranproteinen aus <i>Arabidopsis thaliana</i> -Blattmaterial	26
2.5.2	Isolation von Gesamt-Membranproteinen aus etiolierten <i>Arabidopsis</i> - und Spinat-Keimlingen	26
2.5.3	Isolierung intakter Plastiden	27
2.5.3.1	Isolierung intakter Plastiden aus Spinat und <i>Arabidopsis</i>	27
2.5.3.2	Isolierung intakter Plastiden aus Gerste	27
2.5.3.3	Plastidenzahlbestimmung	27
2.5.4	Chlorophyllbestimmung	27
2.5.5	Proteinkonzentrationsbestimmung	28
2.5.6	Isolierung von Thylakoiden und Stromaproteinen aus Spinat und <i>Arabidopsis</i>	28
2.5.7	Fraktionierung von Spinat-Chloroplasten in Thylakoide und Hüllmembranen	28
2.5.8	Salzwaschung von sonifizierten Spinat-Thylakoiden	29
2.5.9	Thermolysin-Behandlung intakter und beschallter Spinat-Thylakoide	29
2.5.10	Fraktionierung von Thylakoidmembranen in Grana- und Stromathylakoide	29
2.5.11	Dichtegradienten-Zentrifugation von solubilisierten Gerste-(Pro-)Thylakoiden	30
2.5.11.1	Radioaktive Markierung von isolierten Plastiden	30
2.5.11.2	Solubilisierung von Gerste-(Pro) Thylakoiden mit n-Dodecyl- β -D-maltosid	30
2.5.11.3	Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation	30
2.5.11.4	Ko-Immunopräzipitation bei ausgesuchten Fraktionen des Saccharose-Dichtegradienten	31
2.5.12	Immunoaffinitätschromatographie mit dem HCF136-Antiserum	31

2.5.12.1	Herstellung einer HCF136-Antikörper-Sepharose für Immunoaffinitäts-Chromatographie	31
2.5.12.2	Aufreinigung von HCF136 aus solubilisierten Spinat-Thylakoiden mit Hilfe einer HCF136-Antikörper-Sepharose	32
2.5.13	Importversuche von <i>in vitro</i> -synthetisiertem HCF136-Vorläuferprotein in Erbse-Chloroplasten	32
2.5.14	Isolierung von Thylakoiden aus Mesophyll- und Bündelscheidenzellen von Mais und <i>Sorghum</i>	33
2.5.15	Einsatz von biochemischen Quervernetzern zur Interaktionspartner-Aufklärung von HCF136	33
2.5.15.1	Verwendung des Quervernetzers DTSSP	34
2.5.15.2	Verwendung des Quervernetzers EDC	34
2.5.15.3	Verwendung des Quervernetzers APG	34
2.5.16	Radioaktive <i>in vivo</i> -Markierung von <i>Arabidopsis</i> -Keimlingen	35
2.5.17	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	35
2.5.18	Blue-Native-Gelelektrophorese	36
2.5.19	Färbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen	37
2.5.20	Nachweis von Proteinen auf Filtermembranen	37
2.5.20.1	Westerntransfer von Proteinen	37
2.5.20.2	Immunodetektion von Proteinen	37
2.5.21	Autoradiographie radioaktiv markierter Proteine	38
2.5.22	Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i> zur Herstellung von Antisera	38
2.5.22.1	Expression und Aufreinigung von rekombinantem HCF136-Protein	38
2.5.22.2	Immunisierung von Kaninchen und Isolierung einer spezifischen IgG-Fraktion gegen HCF136	39
2.5.22.3	Expression und Aufreinigung weiterer Plastidenproteine	40
3	ERGEBNISSE	41
3.1	Komplementation der Mutante <i>hcf136</i>	41
3.2	Die Eigenschaften des HCF136-Proteins und seine Evolution	42
3.2.1	Das <i>HCF136</i> -Gen wurde im Laufe der Evolution von Plastidenvorläufern ins Kerngenom transferiert	42
3.2.2	Das HCF136-Protein enthält ein unbekanntes, sich wiederholendes Sequenzmotiv	44
3.2.3	Relative Hydrophobizität des HCF136-Proteins	44
3.3	Lokalisation des HCF136-Proteins im Chloroplasten	45
3.3.1	Expression von rekombinantem HCF136-Protein zur Herstellung eines Antiserums	46
3.3.2	Die Spezifität des HCF136-Antiserums	47
3.3.3	Das HCF136-Protein ist mit Thylakoiden assoziiert	48
3.3.4	Das HCF136-Protein ist ein peripheres Membranprotein, das sich durch Salzbehandlung von der Thylakoidmembran ablösen lässt	49
3.3.5	Das HCF136-Protein befindet sich auf der luminalen Seite der Thylakoidmembran	50

3.3.6	Das HCF136-Protein ist in den Stromathylakoiden lokalisiert	52
3.4	Der Importweg des HCF136-Proteins	52
3.4.1	HCF136 wird bei höheren Pflanzen ausschließlich über den Δ pH-Weg in das Lumen der Thylakoide importiert	53
3.4.2	Mutagenese von Untereinheiten der Tat-Translokase in <i>Synechocystis spec.</i>	55
3.5	Der funktionelle Zusammenhang des HCF136-Proteins mit dem Photosystem II	55
3.5.1	Die Reduktion der PS I - Proteine in <i>hcf136</i> ist ein sekundärer Effekt - die Licht-abhängigkeit der Pegel photosynthetischer Membrankomplexe in <i>hcf</i> -Mutanten	55
3.5.2	Analyse der photosynthetischen Pigmente in <i>hcf</i> -Mutanten	58
3.5.3	Das HCF136-Protein akkumuliert differentiell in den Mesophyll- und Bündelscheiden-Chloroplasten von malatbildenden C4-Pflanzen	62
3.5.4	Akkumulation des HCF136-Proteins während der Ergrünung	63
3.6	Überexpression des HCF136-Proteins in <i>Arabidopsis thaliana</i>	64
3.6.1	Lichtstreß-Experimente an HCF136-Überexpressionslinien von <i>Arabidopsis thaliana</i>	65
3.6.2	Untersuchungen zur Chlorophyll-Akkumulation in HCF136-Überexpressionslinien während der Ergrünungsphase etiolierter <i>Arabidopsis</i> -Keimlinge	69
3.7	Suche nach Interaktoren des HCF136-Proteins	72
3.7.1	Das Hefe-Zwei-Hybrid-System	72
3.7.2	Biochemische Quervernetzung	75
3.8	Untersuchungen zur Assoziation des HCF136-Proteins mit Subkomplexen des Photosystems II	76
3.8.1	Lokalisation des HCF136-Proteins im Saccharose-Dichtegradienten solubilisierter Gerste-Thylakoide	77
3.8.2	Lokalisation von HCF136 im Saccharose-Dichtegradienten von Etioplasten-Prothylakoiden aus Gerste – Lichtinduzierte Biogenese des Photosystems II	80
3.8.3	Ko-Immunopräzipitationsexperimente zur Ermittlung von HCF136-Interaktoren	82
3.9	Native Gelelektrophorese <i>in vivo</i> markierter <i>Arabidopsis</i>-Keimlinge – Vergleich zwischen den Mutanten <i>hcf136</i>, <i>hcf154</i>, <i>hcf109</i> und dem Wildtyp	85

4	DISKUSSION	90
4.1	Die Evolution des <i>HCF136</i> -Gens	90
4.2	Das HCF136-Protein ist ein peripheres Membranprotein, das auf der luminalen Seite von Stromathylakoiden lokalisiert ist	90
4.3	Hinweise für einen evolutionären Wechsel des Importweges von HCF136 in das Thylakoidlumen	91
4.4	Das HCF136-Protein ist ein essentieller und spezifischer Faktor für die Biogenese des Photosystems II höherer Pflanzen	93
4.5	Die preferentielle Expression von HCF136 in Mesophyll-Chloroplasten von malatbildenden C4-Pflanzen unterstützt den funktionellen Zusammenhang mit dem Photosystem II	94
4.6	Gibt es eine Kopplung zwischen der HCF136-Expression und der Chlorophyll a-Akkumulation ?	94
4.7	Die Überexpression von HCF136 führt in <i>Arabidopsis thaliana</i> bei Lichtstreß <i>nicht</i> zum Schutz vor Photoinhibition	96
4.8	Der Nachweis von Assoziationen des HCF136-Proteins mit Photosystem II-Subkomplexen	97
4.9	Die Mutante <i>hcf136</i> kann das Reaktionszentrum des Photosystems II nicht assemblieren	99
4.10	Die Funktion des HCF136-Proteins bei der Biogenese des PS II	101
5	ZUSAMMENFASSUNG	104
6	LITERATUR	106

1 Einleitung

1.1 Struktur und Funktion der Chloroplasten

Chloroplasten sind semiautonome Zellorganellen, die in allen photoautotrophen Eukaryonten vorkommen und für die Photosynthese verantwortlich sind. Bei der Photosynthese erfolgt die Umwandlung von Licht in chemische Energie, also die Reduktion von atmosphärischem CO_2 zu Kohlenhydraten bei gleichzeitiger Bildung von molekularem Sauerstoff aus Wasser. Zu den weiteren Funktionen der Chloroplasten zählt die Biosynthese von Aminosäuren, Fettsäuren, Terpenoiden und Tetrapyrrolen sowie die Stickstoffassimilation. Der Chloroplast enthält verschiedene Kompartimente. Seine Hülle grenzt ihn vom Cytoplasma ab und besteht bei höheren Pflanzen aus einer äußeren und inneren Membran (Douce *et al.*, 1984). Die Hüllmembranen umgeben das Stroma als ein lösliches Kompartiment. Im Stroma befinden sich das Plastom, also die zirkuläre DNA der Plastide, der plastidäre Transkriptions- und Translationsapparat und die Enzyme des Calvin-Zyklus zur Fixierung von CO_2 und zur Bildung der Kohlenhydrate (Halliwell, 1981). Die Thylakoide bilden ein inneres Membransystem im Chloroplasten, in das die photosynthetischen Proteinkomplexe eingebettet sind und welches das Thylakoidlumen umschließt.

Die Thylakoidmembran besteht aus zwei morphologisch und funktionell verschiedenen Teilen, den gestapelten Granalamellen und den ungestapelten Stromalamellen. Vier große Proteinkomplexe aus zahlreichen Untereinheiten sind in die Thylakoidmembran eingebettet (Wollman *et al.*, 1999): Photosystem II (PS II), das auf der luminalen Seite mit den peripheren Komponenten des Wasserspaltungsapparates assoziiert ist, der Cytochrom b_6f -Komplex, Photosystem I (PS I) und die ATP-Synthase. Der PS II-Komplex ist hauptsächlich in den Granalamellen angeordnet (Guenther & Melis, 1990), während das PS I und die ATP-Synthase vorwiegend in den Stromabereichen der Thylakoide lokalisiert sind (Anderson, 1986). Der Cytochrom b_6f -Komplex ist in beiden Bereichen gleichmäßig verteilt (Anderson, 1992). Diese heterogene Organisation entlang der Membran steht im funktionellen Zusammenhang mit den photosynthetischen Ereignissen (Melis, 1991; Trissl & Wilhelm, 1993).

Der erste Schritt der lichtgetriebenen Elektronentransportkette (zusammengefasst in Nugent, 1996) ist die vom Photosystem II vermittelte Photooxidation des Wassers, wobei die Elektronen auf Plastochinon übertragen werden. Das so gelieferte Plastochinol kann lateral in der Membran diffundieren und die Elektronen zum zentralen Cytochrom b_6f -Komplex transportieren. Von dort werden die Elektronen über Plastocyanin, ein peripheres Membranprotein im Thylakoidlumen, zum Photosystem I transferiert. Im Reaktionszentrum des PS I findet eine zweite lichtgetriebene Ladungstrennung statt. Die Elektronen werden zur Stromaseite transportiert, wo sie Ferredoxin reduzieren. Ferredoxin wiederum überträgt seine Elektronen unter Vermittlung der Ferredoxin-NADPH-Oxidoreduktase auf NADP^+ zur Bildung von NADPH (Andréasson & Vänngård, 1988). Durch den Elektronentransport werden ein Protonengradient und ein elektrochemisches Potential gebildet, die zusammengefasst als protonenmotorische Kraft die Protonen vom Thylakoidlumen zurück ins Stroma drängen. Die ATP-Synthase koppelt diesen Protonenstrom mit der Bildung von ATP aus ADP und anorganischem Phosphat (Photophosphorylierung). Die Produkte der photochemischen Elektronentransportkette, NADPH und ATP, werden im Calvin-Zyklus bei der Reduktion von CO_2 zu Kohlenhydraten und bei zahlreichen Biosyntheseschritten verbraucht.

1.2 Ursprung und Evolution der Plastiden

Chloroplasten haben sich aus einem cyanobakterienartigen Vorläufer entwickelt, der nach der Endosymbiontentheorie in einen eukaryontischen Einzeller aufgenommen wurde (Douglas, 1994, 1998). Im Genom des rezenteren einzelligen Cyanobakteriums *Synechocystis spec.* gibt es rund 3.000 Gene (Kaneko *et al.*, 1996). Demgegenüber enthalten die Plastidengenome höherer Pflanzen nur noch rund 100 Gene (Sugiura, 1992; Abdallah, *et al.*, 2000). Im Zuge der Evolution sind die meisten Gene des prokaryontischen Genoms verlorengegangen oder wurden in den Kern der Eukaryontenzelle transferiert (Oliver *et al.*, 1989; Martin *et al.*, 1998; Martin & Herrmann, 1998; Blanchard & Lynch, 2000). Der Prokaryont hat einen Teil seines Genoms sowie seinen Translationsapparat behalten und wurde zu einem intrazellulären Organell (Mullet, 1988; Gray, 1999). Die Tatsache, daß ein Teil der Plastidengene bisher nicht in das Kerngenom der Eukaryontenzelle transferiert worden ist, steht möglicherweise im Zusammenhang mit der Notwendigkeit einer Redoxkontrolle der Genexpression der hier betroffenen Gene (Allen *et al.*, 1995; Pfanschmidt *et al.*, 1999; Race *et al.*, 1999). Im Zuge der Genomsequenzierung von *Arabidopsis thaliana* (Goodman *et al.*, 1995) konnte eine erste Abschätzung des Proteoms des Chloroplasten durchgeführt werden (Abdallah *et al.*, 2000). Demnach umfaßt das heutige Proteom des Chloroplasten höherer Pflanzen rund 1900-2500 Proteine, von denen mindestens 650-900 Proteine vom ursprünglichen Cyanobakterien-Vorläufer abstammen. Die tatsächliche Zahl kann jedoch durchaus höher sein. Die Zunahme an Informationen über Sequenzen und die Anordnung der cyanobakteriellen und plastidären Gene in den letzten Jahren sprechen für ein einziges prokaryotisch-eukaryotisches Endosymbiose-Ereignis (Moreira *et al.*, 2000). Demgegenüber haben sich offenbar sekundäre Endosymbiosen aufgrund unvollständiger Phagozytose photosynthetischer Eukaryonten durch heterotrophe Eukaryonten mehrfach unabhängig voneinander in der Evolution ereignet, was zu den komplexen Plastiden in den verschiedenen Algenabteilungen der *Euglenophyta*, *Cryptophyta*, *Chlorarachniophyta* und *Chromophyta* geführt hat (Martin *et al.*, 1992; Kowallik *et al.*, 1993; Douglas *et al.*, 1994, 1998; Gray *et al.*, 1999). Das Kerngenom des Endosymbionten ging dabei entweder verloren oder wurde wie im Falle der *Cryptophyta* zu einem Nukleomorph reduziert (Maier *et al.*, 2000). Der Transfer plastidärer Gene in das Kerngenom der Eukaryontenzelle machte die Entwicklung von Plastiden-Transitsequenzen notwendig, damit die plastidären Proteine nach der Synthese im Cytosol zum Reimport in die Chloroplasten dirigiert werden (Keegstra *et al.*, 1989; de Boer & Weisbeek, 1991; Heins *et al.*, 1998). Unabhängig vom Import in die Plastide müssen viele Chloroplasten-Proteine in die Thylakoidmembran inseriert bzw. in das Thylakoidlumen importiert werden und sind daher mit einer entsprechenden Transitsequenz ausgestattet (Robinson & Mant, 1997). Für den Import in das Thylakoidlumen können zwei Haupt-Importwege beschrieben werden (Cline *et al.*, 1993; Robinson *et al.*, 1998), nämlich der Weg über den ATP-verbrauchenden SecA/SecY-Komplex und der Δ pH-abhängige Weg über den Tat-(twin-arginine-translocase)-Komplex. Die Insertion des kernkodierten LHCP-Proteins des Lichtsammelkomplexes vom Photosystem II in die Thylakoidmembran verläuft über den GTP-abhängigen SRP-(signal recognition particle)-Mechanismus (Keegstra & Cline, 1999). Möglicherweise wird dieser Weg für eine Reihe von integralen Thylakoidmembranproteinen verwendet, sofern keine spontane Insertion vorliegt. Insgesamt verläuft der Weg von Chloroplastenproteinen in die Thylakoidmembran bzw. in das Thylakoidlumen über ähnliche Mechanismen, wie der Export von Proteinen bei Eubakterien in das Periplasma (Dalbey & Robinson, 1999; Berks *et al.*, 2000).

1.3 Struktur und Funktion des Photosystems II

Photosystem II ist einer der vier großen Proteinkomplexe in der Thylakoidmembran sauerstoffbildender photosynthetischer Organismen. Dank Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse ist mittlerweile eine dreidimensionale Struktur des Spinat-Proteinkomplexes bei 8 Å Auflösung verfügbar (Hankamer *et al.*, 1997a; Rhee *et al.*, 1997, 1998; Barber, 1998; Barber & Kühlbrandt, 1999). Zusätzlich sind Strukturdaten von Kristallen aus den Photosystem II-Komplexen von *Chlamydomonas reinhardtii* und *Synechococcus elongatus* vorhanden, die einen Vergleich der cyanobakteriellen und plastidären PS II-Struktur erlauben (Nield *et al.*, 2000; Zuouini *et al.*, 2000). Neben den Röntgenstrukturdaten haben zahlreiche biochemische Arbeiten (Andersson & Styring, 1991; Barber *et al.*, 1997; Hankamer *et al.*, 1997b) und insbesondere Mutagenesen einzelner Untereinheiten (Erickson & Rochaix, 1992; Vermaas, 1993; Pakrasi, 1995) zur Funktionsaufklärung des Photosystems II beigetragen. Das Reaktionszentrum des PS II (Sharma *et al.*, 1997; Tsiotis *et al.*, 1999) besteht aus den beiden ca. 34 kD großen integralen Membranproteinen D1 (PsbA) und D2 (PsbD), dem Cytochrom $b_{559}\alpha\beta$ -Heterodimer (PsbE-PsbF, 9kD und 4 kD; Nanba & Satoh, 1987; Pakrasi *et al.*, 1989a) und dem PsbI-Protein (Tomo *et al.*, 1993). Dabei scheint das PsbI-Protein nicht essentiell für die Funktionsfähigkeit des Reaktionszentrums zu sein (Künstner *et al.*, 1995; Ikeuchi *et al.*, 1995). Entgegen früherer Annahmen (Irrgang *et al.*, 1995) scheint das PsbW-Protein nicht Bestandteil des Reaktionszentrums zu sein (Shi *et al.*, 2000). Das D1/D2-Dimer umfaßt insgesamt 10 Transmembranhelices und bindet 4-6 Chlorophyll a-Pigmente sowie zwei Phäophytin a-Moleküle (Barber & Kühlbrandt, 1999). Ein zentrales Chlorophyll a im D1-Protein, das P680, führt bei Lichtanregung die primäre Ladungstrennung durch und überträgt ein Elektron auf ein Phäophytin (s. Abb. 1).

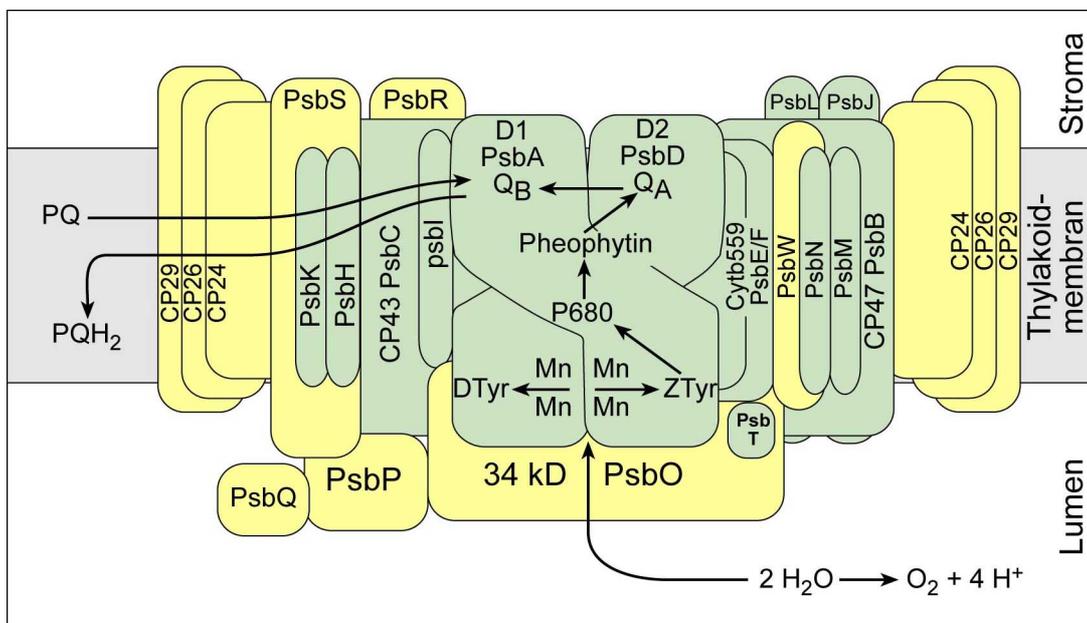


Abb. 1: Schema zur Struktur und Funktion des Photosystems II bei höheren Pflanzen

Dieses reduziert schrittweise ein festgebundenes Plastochinon Q_A im D2-Protein zu Plastochinol. Das Q_A überträgt seine Elektronen an ein reversibel gebundenes Plastochinon Q_B im D1-Protein. Dieses kann als voll reduziertes Plastochinol das D1/D2-Dimer verlassen und

gegen ein oxidiertes Plastochinon des Plastochinol / Plastochinon-Pools aus der Thylakoidmembran ersetzt werden. Das zurückbleibende $P680^+$ erhält ein Elektron zurück von einem spezifischen Tyrosin-Rest ZTyr aus dem D1-Protein und steht somit für eine neue Ladungstrennung zur Verfügung. Das oxidierte ZTyr⁺ wirkt nun seinerseits als starkes Oxidationsmittel. Mit Hilfe eines auf luminaler Seite des D1/D2-Dimers gebundenen Mangan-Clusters mit vier Mn^{2+} -Ionen werden Elektronen von 2 Wassermolekülen aufgenommen. Diese werden in einem Schritt zu molekularem Sauerstoff O_2 oxidiert, wobei die freigesetzten Protonen im Thylakoidlumen zurückbleiben und mitunter zum Aufbau des Protonengradienten dienen. Das Mangan-Cluster wird durch 4-5 Cl^- -Ionen bei der Wasseroxidation unterstützt. Ferner dienen ca. 2-3 Ca^{2+} -Ionen zur Regulation des Mangan-Clusters bei der Wasseroxidation (Ghanotakis & Yocum, 1990; Tsiotis *et al.*, 1999). Das extrinsische luminale 34 kD-Protein (PsbO) ist in Cyanobakterien für die Sauerstoffbildung nicht essentiell (Burnap *et al.*, 1991). Es ist dort ebenso wenig für die Photoassemblierung des Mangan-Clusters notwendig (Qian *et al.*, 1997), führt aber zu dessen Stabilisierung. Demgegenüber führt die Deletion des 34 kD-Protein in *Chlamydomonas* zur vollständigen Hemmung der Sauerstoffbildung und zur Instabilität des gesamten Kernkomplexes (Mayfield *et al.*, 1987). Die Rolle des Cytochrom b_{559} bei der Funktion des Reaktionszentrums als lichtgetriebene Wasser-Plastochinol-Oxidoreduktase ist bis heute nicht geklärt. Eine gerichtete Mutagenese in *Synechocystis spec.*, die eine Bindung des axialen Hämliganden verhinderten, führten jedoch bereits zur Destabilisierung des gesamten Reaktionszentrums (Pakrasi *et al.*, 1991). Dies könnte auf eine Beteiligung des Cytochrom b_{559} am Elektronentransport im Reaktionszentrum hindeuten. Es gibt widersprüchliche Ergebnisse zur genauen Topologie und Stöchiometrie von α - und β -Untereinheit (zusammengefaßt in Stewart & Brudvig *et al.*, 1998). Wahrscheinlich spielt Cytochrom b_{559} eine wichtige Rolle beim Schutz des Reaktionszentrums vor Photoinhibition bei hohen Lichtintensitäten, in dem es einen zyklischen Elektronentransport innerhalb des Reaktionszentrums zurück zum $P680^+$ ermöglicht (zusammengefaßt in Stewart & Brudvig *et al.*, 1998).

Zusammen mit den beiden inneren Chlorophyll a-Antennen-Proteinen CP47 (PsbB) und CP43 (PsbC) bildet das Reaktionszentrum den Kernkomplex des Photosystems II (Barber *et al.*, 2000). Beide Proteine bilden jeweils sechs Transmembranhelices und binden mindestens 14 Chlorophyll a-Pigmente (Barber *et al.*, 2000). Die Bedeutung der inneren Antennenproteine liegt in der Aufnahme der Lichtenergie von den äußeren Antennen und des Lichtsammelkomplexes (LHC II) und der Weiterleitung dieser Lichtquanten zum Reaktionszentrum (Andersson & Styring, 1991).

Neben diesen Komponenten des Photosystem II-Kernkomplexes enthält ein vollständiges Photosystem II höherer Pflanzen noch 15 weitere kleinere Untereinheiten, die zumeist als integrale Membranproteine vorliegen: PsbH (Mayes *et al.*, 1993; Summer *et al.*, 1997), PsbJ, (Lind *et al.*, 1993) PsbK (Ikeuchi *et al.*, 1991; Takahashi *et al.*, 1994), PsbL, PsbM (Ikeuchi *et al.*, 1989), PsbN (Ikeuchi *et al.*, 1989), PsbP (Kochhar *et al.*, 1996), PsbQ, (Grover *et al.*, 1999), PsbR, PsbS (Li *et al.*, 2000), PsbT (Monod *et al.*, 1994; Kapazoglou *et al.*, 1995), PsbW (Irrgang *et al.*, 1995; Shi *et al.*, 2000), PsbX (Shi *et al.*, 1999) und PsbY (Gau *et al.*, 1998). Die genaue Funktion dieser Proteine ist weitgehend ungeklärt, wenngleich Mutagenese-Experimente die Bedeutung einzelner Untereinheiten für die Assemblierung und Stabilität des Photosystems II aufdecken konnten. Dies gilt insbesondere für das 10 kD-Phosphoprotein (PsbH), das für die Herstellung eines funktionsfähigen Kernkomplexes essentiell zu sein scheint (Mayes *et al.*, 1993; Summer *et al.*, 1997). Die Untereinheiten PsbP, PsbQ, PsbR, und PsbW kommen nicht in Cyanobakterien vor, sondern stellen offenbar Neuerwerbungen eukaryotischer photoautotropher Organismen dar (Wollman *et al.*, 1999). Demgegenüber gibt es in

Cyanobakterien zwei Photosystem II-Untereinheiten, PsbU und PsbV (Cytochrom c_{550}), die bei höheren Pflanzen nicht vorkommen (Wollman *et al.*, 1999). Die funktionell aktive Form des gesamten Photosystem II-Komplexes liegt als Dimer mit einem geschätzten Molekulargewicht von rund 450 kD vor (Rhee *et al.*, 1998). Die Anlagerung von peripheren Antennenproteinen CP24/26/29 in mehrfacher Kopienzahl und zwei LHCII-Trimeren führt zu einem Gesamtmolekulargewicht von rund 700 kD (Hankamer *et al.*, 1997a).

1.4 Biogenese des Photosystems II

Die Struktur und grundlegende Funktion des Photosystems II ist aufgrund der zahlreichen biochemischen und biophysikalischen Untersuchungen im Wesentlichen aufgeklärt. Demgegenüber steht man beim Verständnis über die Biogenese dieses multimeren Pigment-Komplexes erst am Anfang. Die Biosynthese eines funktionsfähigen Photosystems II ist lichtabhängig (Westhoff *et al.*, 1990; Eichacker *et al.*, 1990). Die Stöchiometrie des Photosystems II zu den anderen Komplexen der Thylakoidmembran ist nicht konstant, sondern ändert sich in Abhängigkeit von den Lichtbedingungen (Sutton *et al.*, 1987; Guenther & Melis, 1990; Melis, 1991; Klopstech, 1997) und möglicherweise vom Redoxzustand der Thylakoidmembran (Allen *et al.*, 1995; Pfannschmidt *et al.*, 1999). Die Biogenese des Photosystems II kann folglich separat von den anderen Komplexen der Thylakoidmembran reguliert werden. Dies verdeutlicht sich insbesondere in der differentiellen Akkumulation des PS II in Mesophyll- und Bündelscheidenzellen von C₄-Pflanzen des NADP-Malatenzym-Typs (Schuster *et al.*, 1985; Oswald *et al.*, 1990). Das Photosystem II stellt wie die übrigen Thylakoidkomplexe ein genetisches Mosaik dar, d.h. es setzt sich aus plastiden- und kernkodierten Untereinheiten zusammen (Wollman *et al.*, 1999). Die Biogenese eines funktionsfähigen Komplexes erfordert somit die koordinierte Genexpression im Cytosol und in der Plastide (Taylor, 1989; Erickson & Rochaix, 1992; Goldschmidt-Clermont, 1998), den Plastiden- und Thylakoidlumen-Import kernkodierter Untereinheiten (Heins *et al.*, 1998; Robinson *et al.*, 1998), die anschließende Assemblierung der Untereinheiten in der Thylakoidmembran (Cohen *et al.*, 1995; Wollman *et al.*, 1999) und parallel dazu die Einbindung der photosynthetischen Pigmente (Herrin *et al.*, 1992; Mullet *et al.*, 1999). Die Koordination der Genexpression von kernkodierten und plastomkodierten PS II-Untereinheiten wird insbesondere dadurch sichergestellt, daß die Genexpression im Chloroplasten auf allen Ebenen von zahlreichen kernkodierten Hilfsfaktoren abhängig ist bzw. beeinflusst wird (Goldschmidt-Clermont, 1998). Die meisten dieser Proteine scheinen eine mehr oder weniger essentielle Hilfsfunktion bei der Biogenese der Thylakoidkomplexe auszuüben und stellen keine Strukturkomponenten der Plastide dar. Die Bezeichnung "regulatorische Faktoren" trifft dabei streng genommen nur in Ausnahmefällen zu (Danon & Mayfield, 1994; Kim & Mayfield, 1997; Koivuniemi *et al.*, 1995), aber sie erleichtert bei Mutagenese-Untersuchungen die Beschreibung der Phänomene. In den meisten Fällen ist die Bezeichnung "Biogenesefaktoren" dagegen besser geeignet.

1.4.1 Die primären Schritte

Kontrollmechanismen zur Biogenese von Chloroplasten aus undifferenzierten Proplastiden und im speziellen des Photosystems II vollziehen sich auf allen Ebenen der Genexpression, d.h. bei der Transkription, bei posttranskriptionellen Prozessen, bei der Translation und bei posttranslationalen Ereignissen, zu denen insbesondere auch die Komplexassemblierung zählt

(Jensen *et al.*, 1986; Goldschmidt-Clermont, 1998). Die Identifizierung der an diesen Prozessen beteiligten und meist nukleär kodierten Faktoren ist häufig der Isolierung und Charakterisierung von Photosynthesemutanten (*hcf*-Mutanten) aus Mais (Miles, 1982; Barkan *et al.*, 1986; Miles, 1994), *Chlamydomonas reinhardtii* (de Vitry *et al.*, 1989; Rochaix, 1995) und *Arabidopsis thaliana* (Meurer *et al.*, 1996b) zu verdanken. Für die Transkription der meisten plastidären Gene mit typischer prokaryotischer Promotorstruktur (Igloi & Kössel, 1992) steht eine plastidenkodierte RNA-Polymerase zur Verfügung (Gruissem, 1989; Gruissem & Tonkyn, 1993), deren Aktivität von nukleär kodierten σ -Faktoren abhängig ist (Isono *et al.*, 1997). Die Existenz einer zweiten, kernkodierten RNA-Polymerase konnte nachgewiesen werden (Lerbs-Mache, 1993; Stern *et al.*, 1997). Transkriptionsanalysen deuten darauf hin, daß die bakterienhomologe plastidäre RNA-Polymerase besonders bei der Transkription der Photosynthesegene mitwirkt, während die nukleär kodierte Polymerase mehr auf die Transkription der Gene spezialisiert ist, deren Produkte im plastidären Transkriptions- und Translationsapparat involviert sind (Hajdukiewicz *et al.*, 1997). Die Transkriptionsraten plastidärer Photosynthesegene ändern sich in der Plastidendifferenzierung nur unwesentlich, wohingegen deutlich unterschiedliche Transkriptspiegel der einzelnen Untereinheiten nachgewiesen werden können (Deng & Gruissem, 1987; Deng *et al.*, 1989). Folglich scheinen posttranskriptionale Kontrollmechanismen eine weitaus bedeutendere Rolle in der an unterschiedliche Lichtbedingungen angepaßten Biogenese der Thylakoidkomplexe zu spielen (Rochaix, 1992; Mayfield *et al.*, 1995; Sugita & Sugiura, 1996). Dies gilt im Besonderen auch für das Photosystem II. Da viele plastidäre Gene in polycistronischen Transkriptionseinheiten zusammengefaßt sind und teilweise Introns enthalten (z.B. *psbB*-Operon), sind komplexe RNA-Prozessierungsvorgänge notwendig, um letztendlich monocistronische Einheiten für die Translation zu liefern (Westhoff & Herrmann, 1988). Einige cis- und transregulatorische Komponenten, die bei der Prozessierung und Stabilität der mRNAs beteiligt sind, konnten identifiziert werden (Rochaix, 1992; Barkan *et al.*, 1994; Mayfield *et al.*, 1995; Fisk *et al.*, 1999) oder es konnte die Existenz weiterer Faktoren nachgewiesen werden (Monod *et al.*, 1992; Meurer *et al.*, 1996a; Felder, 1999). Weitere 5'- und 3'-Prozessierungen der monocistronischen Einheiten (z.B. *psbD*-mRNA, *psbH*-mRNA) sind wichtig für die Stabilität und Translatierbarkeit der Transkripte (Nickelsen *et al.*, 1994; Hayes *et al.*, 1996; Levy *et al.*, 1997; Stern *et al.*, 1998; Vaistij *et al.*, 2000; Boudreau *et al.*, 2000). Einige Transkripte (z.B. *psbA*) erfahren nach der 3'-Prozessierung eine nachträgliche Polyadenylierung, die in Plastiden einen schnelleren Abbau der mRNA bewirkt (Kudla *et al.*, 1996). Die Summe der posttranskriptionellen Ereignisse dient dazu, Transkripte der Translationsmaschinerie zugänglich zu machen. Die Translation plastidärer mRNAs benötigt transregulatorische Faktoren, die mit der 5'-untranslatierten Region der Ziel-mRNA interagieren (z.B. bei *psbC*-mRNA) (Danon & Mayfield, 1991; Zerges *et al.*, 1997). Die Aktivität dieser transregulatorischen Faktoren kann möglicherweise durch den Redoxzustand der Thylakoidmembran kontrolliert werden, wie für die *psbA* mRNA gezeigt werden konnte (Danon & Mayfield, 1994). Die Translation der PS II-Kernkomplexproteine geht offenbar einher mit der Membraninsertion, so gezeigt für das D1-Protein (Mattoo *et al.*, 1987; Zhang *et al.*, 2000).

1.4.2 Die Assemblierung des Photosystems II

Bei der Aufklärung über die komplexen Vorgänge bei der Assemblierung des Photosystems II sind in den letzten 15 Jahren durch zahlreiche biochemische Untersuchungsmethoden an *Synechocystis spec.*, *Chlamydomonas reinhardtii*, Spinat und Gerste erhebliche Fortschritte

erzielt worden (Wollman *et al.*, 1999; Choquet & Vallon, 2000). Insbesondere die Untersuchung von Mutanten in den Strukturgenen des PS II hat dazu beigetragen, den Prozeß des schrittweisen Zusammenbaus der Einzelkomponenten besser zu verstehen. Das D1-Protein steht seit langem im Zentrum des Interesses vieler Untersuchungen. Dies hat seine Ursache einerseits in der Tatsache, daß es Angriffspunkt für eine Reihe von Herbiziden ist (Mackay *et al.*, 1993). Hinzu kommt andererseits eine Besonderheit dieses Proteins, bei Lichtstreß sehr schnell geschädigt zu werden (Photoinhibition), so daß ein ständiger Austausch ("Turn-over") zur Aufrechterhaltung eines funktionsfähigen PS II-Pools in der Thylakoidmembran erforderlich ist (van Wijk *et al.*, 1997). Die Kenntnisse, die über die Synthese, Membraninsertion und Assemblierung des D1-Proteins gewonnen wurden, sollten sich zumindest teilweise auf alle Untereinheiten des Kernkomplexes vom Photosystem II übertragen lassen. So findet die kotranslationale Insertion der neusynthetisierten Untereinheiten offenbar an membran- gebundenen Polysomen in den freien Stromathylakoiden statt (de Vitry *et al.*, 1989; Jagendorf & Michaels, 1990; van Wijk *et al.*, 1996). In Untersuchungen an *Chlamydomonas* konnte als kleinste Assemblierungseinheit ein Komplex aus D1/D2/Cytochrom b_{559} /CP47 identifiziert werden (de Vitry *et al.*, 1989). Dieser Komplex kann offenbar alleine bereits zu den gestapelten Granabereichen transportiert werden. Die Anlagerung von CP43 ist ein davon unabhängiger Prozeß. Dies konnte durch Auftrennung von Thylakoidkomplexe durch nichtdenaturierende Gelelektrophorese bestätigt werden (Adir *et al.*, 1990) In Gerste-Thylakoiden konnte als kleinste Assemblierungseinheit sogar das Reaktionszentrum (RC) alleine, bestehend aus D1/D2/Cytochrom b_{559} , nachgewiesen werden, das durch Anlagerung von CP47 in den bei *Chlamydomonas* bereits beschriebenen RC-CP47-Komplex übergeht (Müller, 2000). Da man in Etioplasten aus Gerste ebenfalls einen Präkomplex aus pD1/D2/Cytochrom b_{559} identifizieren konnte (Müller und Eichacker, 1999), scheint dies in der Tat die kleinste Assemblierungseinheit darzustellen, aus der der RC-CP47-Komplex erst hervorgeht. Der durch Anlagerung von CP43 entstehende Kernkomplex sollte als Ausgangspunkt für die komplette Assemblierung aller weiterer Untereinheiten zu einem kompletten Photosystem II-Komplex dienen, was auch für die abschließende Dimerisierung gilt. Parallel zur Assemblierung bzw. im Anschluß finden im Kernkomplex des Photosystems II noch posttranslationale Modifikationen an den Untereinheiten statt. Dazu zählen die Einbindung der photosynthetischen Pigmente (Eichacker *et al.*, 1990), beim D1-Protein die C-terminale Prozessierung (Bowyer *et al.*, 1992) und Phosphorylierungen auf der stromalen Seite der Untereinheiten (Aro *et al.*, 1993).

Die Bedeutung der photosynthetischen Pigmente. Eine Sonderform der Plastide, der Etioplast, entsteht aus Proplastiden bei Etiolierung von Keimlingen im Dunkeln. Die chlorophyllfreien Etioplasten besitzen parakristalline Prolamellarkörper, von denen wenige ungestapelte Thylakoide in ungeordneter Weise ausgehen (Wellburn & Hampp, 1977). Die letzten Schritte der Chlorophyll-Synthese sind lichtabhängig und laufen daher erst bei Belichtung von Etioplasten ab (Griffiths, 1975; Rüdiger *et al.*, 1980). Zahlreiche Untersuchungen zur Synthese und Akkumulation der PSII-Kernkomplex-Untereinheiten wurden in isolierten Etioplasten durchgeführt (Mullet, 1988; Mullet *et al.*, 1989; Eichacker *et al.*, 1990, 1992; Müller & Eichacker, 1999). Dabei konnte erarbeitet werden, daß die stabile Akkumulation der PS II-Kernkomplex-Untereinheiten vom Chlorophyll a-Einbau abhängig ist. Ferner wurde festgestellt, daß der Chlorophyll a- und β -Carotin-Einbau während der kotranslationalen Insertion des D1-Proteins in die Thylakoidmembran stattfindet. Darüber hinaus scheint die Bindung des Chlorophyll a auch wichtig für die Vollendung der kotranslationalen Membraninsertion zu sein (Kim *et al.*, 1991, 1994b). An bestimmten Punkten der Translation kann ein "ribosome pausing"

beobachtet werden, d.h. die Verzögerung der D1-Translationselongation. Diese Verzögerung führt zu bestimmten D1-Intermediaten und nimmt in maturen Chloroplasten zu, wo die Chlorophyllsyntheserate möglicherweise limitiert ist. Neben diesem biochemischen Befund konnte eine Mutante von Gerste charakterisiert werden (*vir-115*), bei der es im Laufe der Plastidenentwicklung zu einem Verlust der D1-Synthese kommt, was letztendlich die Inaktivierung des gesamten Photosystems II nach sich zieht (Simpson *et al.*, 1989). Die Analyse der D1-Translation in dieser Mutante legt nahe, daß dort ein kernkodiertes Gen defekt ist, das für die Stabilisierung der Translationsintermediate des D1-Proteins essentiell ist (Kim *et al.*, 1994c). Das *vir-115*-Genprodukt stellt vermutlich eine Art Chaperon dar, das möglicherweise die Chlorophyll a-Bindung an das D1-Protein katalysiert und so für eine kontinuierliche Synthese und Akkumulation sorgt. In *in vitro*-Translationsansätzen konnte in An- oder Abwesenheit von Chlorophyll a allerdings keine wesentliche Änderung in der Elongationsrate des D1-Proteins beobachtet werden (Kim *et al.*, 1994a). Dennoch spielt Licht eine entscheidende Rolle in der Stimulation der D1-Elongation (Edhofer *et al.*, 1998), was indirekt die Translationsförderung durch Chlorophyll a bestätigen würde.

Die C-terminale Prozessierung des D1-Proteins. Das D1-Protein wird in einer Vorstufen-Form synthetisiert und in die Thylakoidmembran inseriert. Diese Vorstufe pD1 besitzt eine C-terminale Erweiterung und ist etwa 2 kD größer als das reife Protein. Dieses Phänomen ist evolutionär konserviert (Shestakov, 1994; Anbudurai *et al.*, 1994; Oelmüller *et al.*, 1996). Es konnte gezeigt werden, daß die Entfernung dieser C-terminalen Erweiterung notwendig für die Assemblierung des Mangan-Clusters ist (Bowyer *et al.*, 1992). Die Prozessierung erfolgt durch eine spezifische luminal lokalisierte Protease mit der Bezeichnung CtpA (Anbudurai, 1994). Dennoch scheint die Prozessierung keine Voraussetzung für die Assemblierung zu sein (van Wijk *et al.*, 1996). Und auch bei Hemmung der Assemblierung findet die C-terminale Prozessierung des D1-Proteins statt (van Wijk *et al.*, 1996). Möglicherweise besteht der Sinn der C-terminalen Erweiterung darin, eine zu frühe Photoassemblierung des Mangan-Clusters (z.B. vor der kompletten Assemblierung des Reaktionszentrums) zu verhindern. In diesem Sinne wird durch die Prozessierung die Kinetik der Assemblierung gesteuert.

Die Assemblierung des Reaktionszentrums (RC). In Etioplasten können die Proteine D2 (PsbD) und Cytochrom b_{559} (PsbE/F) immunologisch nachgewiesen werden. Dies gilt nicht für das D1-Protein. Der Nachweis der unprozessierten Form pD1 gelingt jedoch durch *in organello*-Translation in der Gegenwart von ^{35}S -Methionin bei Dunkelheit (Müller & Eichacker, 1999). Dies zeigt deutlich, daß D2 und Cytochrom b_{559} in Etioplasten offenbar in geringen Mengen stabil akkumulieren. Das D1-Protein hingegen wird zwar synthetisiert, bleibt aber in Abwesenheit von Chlorophyll a instabil und wird daher direkt wieder abgebaut (Mullet *et al.*, 1989). Der Nachweis von D2 und Cyt b_{559} in einem höher molekularen Komplex zusammen mit D1 in Etioplasten führte zu der Annahme, daß auch hier die Assemblierung des Reaktionszentrums prinzipiell stattfindet (Müller & Eichacker, 1999). Allerdings erfordert die stabile Akkumulation die Anwesenheit von Chlorophyll a. Die schwache Akkumulation von D2/Cyt b_{559} und die überlappende Lokalisation im Saccharose-Dichtegradienten legt nahe, daß diese beiden Proteine einen Subkomplex bilden, der als eine Art Rezeptor für die kotranslationale Insertion des D1-Proteins in die Thylakoidmembran dient. Damit würde eine kotranslationale Assemblierung vom D1-Protein unter Bildung des Reaktionszentrums wahrscheinlich. In Chloroplasten aus Spinat konnte unter Verwendung von *in vitro*-Translationsexperimenten diese Idee bestätigt werden (van Wijk *et al.*, 1995; van Wijk *et al.*, 1996). So ist es unter

anderem erfolgreich gelungen, mit einer Ko-Immunopräzipitation der Elongationsintermediate der D1-Translation bereits D2 und CP47 mitzufallen, was ein deutlicher Hinweis auf eine kotranslationale Assemblierung des D1 mit dem D2-Protein ist (Zhang *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2000). Ferner konnte eine Interaktion der naszierenden D1-Kette mit cpSRP54 nachgewiesen werden (Nilsson *et al.*, 1999). Allerdings favorisieren die *in vitro*-Experimente zunächst nur eine Assemblierung von D1 und D2 und erst nachfolgend erfolgt die Anlagerung von Cytochrom b_{559} , PsbI und CP47 (van Wijk *et al.*, 1997). Außerdem läßt sich in diesen Ansätzen auch stets eine nicht-assemblierte D1-Population nachweisen. Letztendlich wird aber deutlich, daß sich insbesondere beim D1-Protein die Prozesse der Translation, Chlorophyll a-Einbindung und Assemblierung in Chloroplasten wahrscheinlich *in vivo* kinetisch kaum voneinander trennen lassen.

Die nachfolgende Anlagerung von CP47 scheint ein sehr schneller Vorgang zu sein, so daß man in Chloroplasten aus Spinat oder *Chlamydomonas* bisher als kleinste Assemblierungseinheit den RC-CP47-Komplex isoliert hat. Zu welchem Zeitpunkt die Einlagerung der zahlreichen Chlorophyll a-Pigmente und Carotinoide in die inneren Antennen erfolgt, ist noch nicht endgültig geklärt. Interessanterweise konnte durch zielgerichtete Mutagenesen in Cyanobakterien gezeigt werden, daß die luminalen Extensionen von CP47 (Wu *et al.*, 1996), CP43 (Rosenberg *et al.*, 1999) und PsbE (Tae *et al.*, 1992) essentielle Bereiche für den Assemblierungsprozeß des PS II-Kernkomplexes enthalten.

Assemblierung und Deassemblierung im PS II-Reparaturzyklus. Die Dimerisierung des PS II findet offenbar zu einem späten Zeitpunkt der Assemblierung statt (van Wijk *et al.*, 1996). Vermutlich werden die PS II-Kernkomplexe vor der Dimerisierung schon zu den Grana befördert (de Vitry *et al.*, 1989), so daß erst dort die Suprastruktur ausgebildet wird. Dies gilt wahrscheinlich ebenso für die Anlagerung der LHClI-Trimere. In *in vitro*-Experimenten gelingt die Assemblierung stets nur bis zum Kernkomplex (van Wijk *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 2000). Dies deutet auf eine Beteiligung kernkodierter Faktoren an der Dimerisierung des PS II hin. Bisher ist gezeigt worden, daß offenbar das plastidenkodierte Protein PsbH (Summer *et al.*, 1997) und das kernkodierte Protein PsbW (Shi *et al.*, 2000) an der Stabilisierung der PS II-Dimere beteiligt sind. Diese peripheren PS II-Komponenten sind alleine aber wahrscheinlich nicht hinreichend für eine Dimerstabilisierung. Die Photosystem II-Biogenese wird abgeschlossen durch die Phosphorylierung einzelner Untereinheiten (in höheren Pflanzen insbesondere D1, D2, CP43, PsbH) (Wollman *et al.*, 1999). Beobachtungen bei Spinat zufolge scheint die Phosphorylierung die lichtinduzierte Degradation von D1 und D2 zu reduzieren und hat somit einen stabilisierenden Effekt (Koivuniemi *et al.*, 1995). In diesem Sinne ist die reversible Phosphorylierung ein Steuerelement im D1-Austausch beim PS II-Reparaturzyklus in Folge von Photoinhibition: Die Dephosphorylierung des D1-Proteins stellt offenbar die Voraussetzung für die Degradation des photogeschädigten D1-Proteins dar (Aro *et al.*, 1993; Koivuniemi *et al.*, 1995; van Wijk *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2000). Bei lichtinduzierter Schädigung des D1-Proteins erfolgt eine endolytische Spaltung von stromaler Seite durch die FtsH-Protease (Lindahl *et al.*, 1996; Rintamaki & Aro, 1996; Lindahl *et al.*, 2000), wobei ein charakteristisches Fragment von 23 kD entsteht (Lindahl *et al.*, 2000). Die D1-Fragmente müssen im Chloroplasten-Proteasom abgebaut werden (Shanklin *et al.*, 1995). Durch die Lichtschädigung kommt es zur teilweisen Deassemblierung des Photosystems II und zur Migration der Subkomplexe zu den exponierten Stromabereichen (Aro *et al.*, 1993). Die Expression des D1-Proteins wird bei Lichtstreß erhöht (Kettunen *et al.*, 1997). In den Stromathylakoiden kann anschließend die kotranslationale Assemblierung eines neu

synthetisierten D1-Proteins in PS II-RC-CP47-Komplexe stattfinden und damit die Reassemblierung des Photosystems II einläuten (Aro *et al.*, 1993; Zhang *et al.*, 2000).

Die Beteiligung von Hilfsfaktoren bei der Assemblierung – Chaperone und Proteasen. Der klassischen Vorstellung zufolge sind molekulare Chaperone ubiquitär vorkommende Hilfsfaktoren, die bei der Faltung von neusynthetisierten Proteinen mitwirken. Chaperone vom hsp70-Typ binden insbesondere an hydrophobe Bereiche naszierender Proteinketten und verhindern so unerwünschte Protein-Protein-Interaktionen, Mißfaltungen und Aggregationen. Chaperonine (hsp60-Typ, "GroEL/GroES") bilden tonnenartige Multimerkomplexe, in denen die geordnete Proteinfaltung in einem intensiv ATP-verbrauchenden zyklischen Prozeß stattfinden kann (Hartl, 1996). Mißgefaltene Proteine müssen von Proteasen abgebaut werden. Auch in Cyanobakterien und Chloroplasten können entsprechende Hilfsfaktoren nachgewiesen werden, die eine zu den *E. coli*-Chaperonen homologe Funktion übernehmen (Marshall *et al.*, 1990; Webb, 1994; Viitanen *et al.*, 1995; Schlicher & Soll, 1997). Die Bedeutung der chaperonvermittelten korrekten Faltung von Proteinen für eine erfolgreiche Assemblierung konnte u.a. an der Ribulosebisphosphat-Carboxylase/Oxygenase (RubisCO) demonstriert werden (Gatenby & Ellis, 1990). Ferner wurde gezeigt, daß ein hsp70-Protein an der Insertion von LHCP in die Thylakoidmembran beteiligt ist (Yalovsky *et al.*, 1992). Die Zusammenarbeit von Chaperonen und Proteasen führt also nicht nur zur korrekten Proteinfaltung, sondern ist auch Voraussetzung für erfolgreiche Assemblierung von Proteinkomplexen. In jüngster Zeit wurde dieses Verständnis durch eine weitere Entdeckung bereichert: ATP-abhängige Proteasen können neben dem Abbau von Proteinen auch Chaperon-Funktion übernehmen (Tzagoloff *et al.*, 1994; Arlt *et al.*, 1996; Gottesman *et al.*, 1997; Suzuki *et al.*, 1997). Es handelt sich hier um Proteasen der Clp-Familie, der AAA-Familie (FtsH-Familie) und der Lon-Familie, die in verschiedenen Bakterien und Mitochondrien von *Saccharomyces cerevisiae* ausführlich beschrieben wurden. In Chloroplasten konnten die Proteine ClpA und ClpP nachgewiesen werden (Shanklin *et al.*, 1995). ClpA zeigt ATPase-Aktivität und bildet einen multimeren Komplex, der für sich alleine *in vitro* Chaperon-Eigenschaften besitzt und Substrate unter ATP-Verbrauch zu nativen Proteinen zu falten vermag. Findet zusätzlich die Bindung von ClpP an das ClpA-Oligomer statt, so erfolgt statt dessen ebenfalls unter ATP-Verbrauch die Degradation des Substrates. Ob *in vivo* die Chaperon-Aktivität von ClpA überhaupt zum Tragen kommt oder ob dies nicht vielmehr eine Möglichkeit darstellt, ungefaltene Substrate in einer löslichen und damit einer für ClpP zugänglichen Konformation zu halten, ist noch nicht klar. Es ist jedoch denkbar, daß von ClpA gebundene Substrate von der allgemeinen Chaperon-Maschinerie aufgenommen werden können, so daß sie der Proteolyse entzogen werden. Die Kinetik entscheidet letztendlich über den Weg des neu synthetisierten Proteins, d.h. ob es degradiert oder korrekt gefaltet wird. Neben diesen allgemeinen Chaperonen wurde in den letzten Jahren durch genetische Untersuchungen eine ganze Reihe von komplexspezifischen Hilfsfaktoren in *E. coli*, Mitochondrien und Chloroplasten identifiziert, die bei der eigentlichen Assemblierung essentiell sind. Dazu zählen Faktoren für die mitochondriale Cytochrom-Oxidase (Altamura *et al.*, 1996; Glerum *et al.*, 1995, 1997) und Succinat-Dehydrogenase (Dibrov *et al.*, 1998) in *S. cerevisiae*, Faktoren für den mitochondrialen Komplex I in *Neurospora crassa* (Kuffner *et al.*, 1998), ein Faktor für die Nitratreduktase in *E. coli* (Liu & DeMoss, 1997) und Faktoren für das Photosystem I (Ruf *et al.*, 1997; Boudreau *et al.*, 1997).

1.5 Die Photosynthesemutante *hcf136* von *Arabidopsis thaliana*

Um weitere Einblicke in die Rolle nukleär kodierter Hilfs- und Regulationsfaktoren bei der Biogenese der photosynthetischen Komplexe in der Thylakoidmembran zu erhalten, wurde ein genetischer Ansatz gewählt. Unter T-DNA-mutagenisierten Pflanzen von *Arabidopsis thaliana* (Feldmann, 1991, 1992) konnte die Photosynthesemutante *hcf136* isoliert werden (Abb. 2), die sich in spektroskopischen und immunologischen Analysen durch einen drastischen Defekt in der Biogenese des Photosystems II auszeichnet (Meurer, 1996c). Eine deutliche Verminderung der Proteinspiegel im Photosystem I wurde ebenfalls beobachtet, während der mit dem Photosystem II assoziierte Lichtsammelkomplex LHCII in normalen Mengen akkumuliert wird.

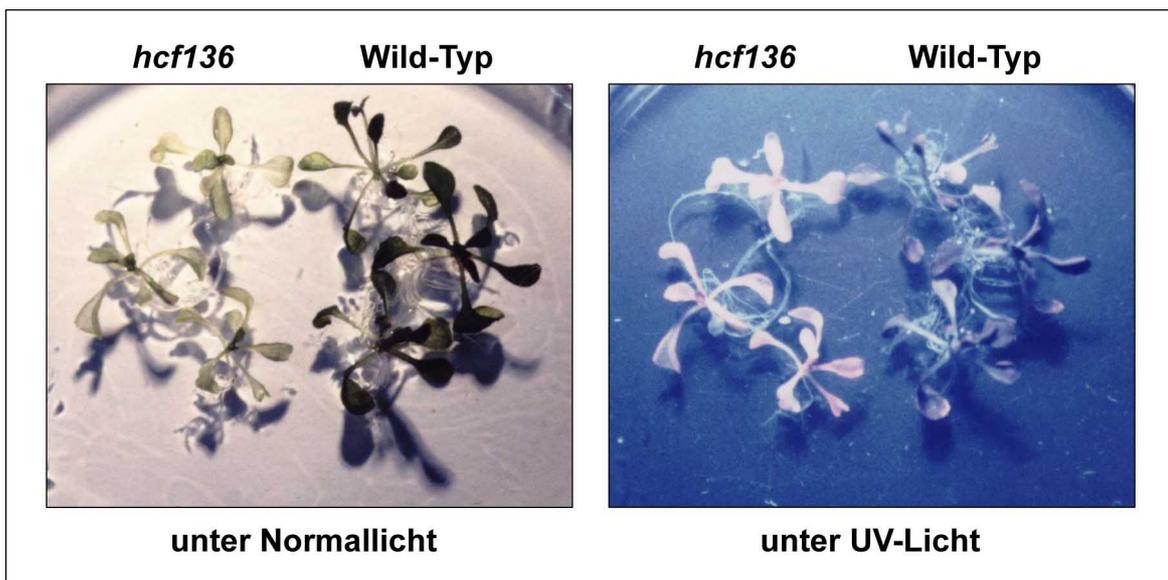


Abb. 2: Phänotyp von *hcf136*-Keimlingen und Wildtyp-Pflanzen von *Arabidopsis thaliana* in Gewebekultur unter Normal- und unter UV-Licht.

Es wurde gezeigt, daß die Spiegel und Größen der mRNAs von nukleär- und plastidär-kodierten PS II-Untereinheiten im Vergleich zum Wildtyp unverändert sind. Einbauexperimente mit ^{35}S -Methionin wiesen darauf hin, daß die Translation der PS II-Kernkomplex-Untereinheiten in der Mutante nicht bzw. nur schwach betroffen ist.

Da die T-DNA-Insertion mit der Mutation gekoppelt war, wurden über inverse PCR (Hartl *et al.*, 1996) die an die T-DNA angrenzenden genomischen DNA-Bereiche amplifiziert und kloniert (Meurer, 1996c). Mit Hilfe dieser genomischen Sequenzen wurde der zugehörige cDNA-Klon des Gens *HCF136* aus einer cDNA-Bank von *Arabidopsis thaliana* isoliert (Plücken, 1997).

1.6 Ziele dieser Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollte zunächst gezeigt werden, daß die T-DNA-Insertion in das Gen *HCF136* für den mutanten Phänotyp verantwortlich ist. Das zentrale Ziel dieser Arbeit bestand darin, die Funktion des Faktors HCF136 bei der Biogenese des Photosystems II zu analysieren. Als Ausgangspunkt sollten bioinformatische Untersuchungen dienen. Mit Hilfe von Immunolokalisationsexperimenten sollte der Wirkort des HCF136-Proteins bestimmt werden. Anschließend sollte durch biochemische und physiologische Analysen die Verknüpfung des HCF136-Proteins mit der Photosystem II-Biogenese überprüft werden. Die Untersuchung von transgenen Linien von *Arabidopsis thaliana* sollte klären, welche Auswirkungen eine HCF136-Überexpression beim Ergrünungsprozeß von Keimlingen und bei der Bewältigung von Lichtstressbedingungen hat. Schließlich sollte mit Hilfe molekularbiologischer und biochemischer Methoden der Nachweis von Interaktionen des Faktors HCF136 mit anderen Proteinen erbracht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien hatten in der Regel p.a.-Qualität und wurden sofern nicht anders angegeben von den Firmen Clontech (Palo Alto, USA), Difco (Detroit, USA), Duchefa (Haarlem, Niederlande), Gibco BRL (Eggenstein), Janssen (Beerse, Belgien), Merck (Darmstadt), Novagene-Calbiochem (Madison, USA), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma-Aldrich (München) [umfaßt bisherige Firmen Fluka (Buchs, Schweiz) und Riedel-de-Haen (Seelze)] bezogen. Sämtliche Antibiotika wurden von Sigma-Aldrich (München) bezogen.

2.1.2 Enzyme

Enzyme und die entsprechenden Reaktionspuffer wurden von den Firmen Clontech (Palo Alto, USA), MBI Fermentas (St. Leon-Rot) QBiogene (Illkirch, Frankreich), Roche Diagnostics (Mannheim) und Stratagene (Heidelberg) bezogen.

2.1.3 Bakterien- und Hefestämme

E.coli DH5 α (Stratagene, Heidelberg)

E.coli BL21 DE3 pLysE (Novagene, Madison, USA)

E.coli S17-1 (Simon, 1984)

E.coli XL1-Blue MRF' (Bullock *et al.*, 1987)

Agrobacterium tumefaciens GV3101 (pMK90RK) (Koncz *et al.*, 1994)

Saccharomyces cerevisiae PJ69-4A (Mat a) (James, 1996)

Saccharomyces cerevisiae Y187 (Mat α) (Harper *et al.*, 1993)

Synechocystis spec. PCC 6803, glucosetoleranter Laborstamm

2.1.4 Plasmide

Für Standard-Klonierungen wurde der Vektor pBluescript KSII+ (Stratagene, Heidelberg) verwendet. Für Klonierungen in *Agrobacterium tumefaciens* wurde der Vektor pPCV91 (Strizhov *et al.*, 1996) eingesetzt. Protein-Überexpressionen in *E.coli* erfolgten im Expressionsplasmid pGEX4T3 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden). Für das Hefe-Zweihybrid-System wurden die Vektoren pGBT9 und pGAD10 (Clontech, Palo Alto, USA) verwendet. Eine Auflistung aller verwendeter / hergestellter Klone ist in Tabelle 1 enthalten.

2.1.4 Verwendete Oligonukleotide

Sämtliche Oligonukleotide wurden von der Firma Gibco BRL (Eggenstein) bezogen. Eine Auflistung aller in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide (Primer), einschließlich ihrer Positionen in den Zielgenen und der Verwendungszweck sind in Tabelle 1 enthalten.

Klon	Gen	NS- Position	Hin-Primer	Rück-Primer	Verwendung
pPCV91	/	/	GGAGAGGACCTCGAGCTGCAG	GCTCAACACATGAGCGAAACCC	PCR, Sequenz.
pGEX4T3-136-EX	<i>HCF136</i>	226-1214	CACGGATCCGCGAGAGCTGATGAACAG	GTGCTCGAGCTTCAGCCAACATATCGGAGC	Proteinexpression
pGEX4T3-Ycf39-EX	slr0339	28-947	CCGAATTCGGAACCCCTCGGCAGGC	GTGCTCGAGTCGGTTTGGGTCGGG	Proteinexpression
pGEX4T3-psbE-EX	psbE/F	1-270	CCGAATTCATGTCTGGAAGCACAGGAG	GTGCTCGAGCTATAGTCATTGGGTCCTCC	Proteinexpression
pGEX4T3-psbH-EX	psbH	1-141	CACGGATCCATGGCTACACAAACTG	CACCTCGAGTGCAACACCCATCAAAGG	Proteinexpression
pGAD424-hoxR	hoxR	262-519	ACTCGAGGAATGGAGGAGAAGTTTGCTG	CGAGAATTCCTTCTGACCAGAGGTAAGAGC	Hefe Zwei-Hybrid
pGAD424-psbE	psbE/F	133-300	ACTCGAGGAGATGTGTTTCGGGAGCCCT	CGAGAATTCGCGCACTGTAAAAATTGG	Hefe Zwei-Hybrid
pGAD424-psbEF	psbE/F	133-300	ACTCGAGGAGATGTGTTTCGGGAGCCCT	CGAGAATTCGCGCACTGTAAAAATTGGATAG GTCCTATCTATAGTCATTGGGTCCTCCTAAAA AGATCTACTAAATTC	Hefe Zwei-Hybrid
pGAD424-psbEF	psbE/F	232-300	GAATTTAGTAGATCTTTTCAGGAGGACCCAAT GAC (Mutagenese-Primer)	CGAGAATTCGCGCACTGTAAAAATTGG	Hefe Zwei-Hybrid
pGAD424-psbA	psbA	922-1062	CTCGAATTCGATAGTCAAGGACGTG	CTCGTCTGACTTATCCATTTGTAGATGGAGC	Hefe Zwei-Hybrid
pGAD424-psbA	psbD	883-1062	CTCGAATTCGCTGCCTATGACTTCG	TCAGTCTGACTTAAAGAGCGTTTCCACG	Hefe Zwei-Hybrid
pGBT9-136ges	<i>HCF136</i>	270-1214	CACGGATCCCTGATGAACAGTTATCCGAATG G	CGTGCTGCAGCTTCAGCCAACATATCGGAC	Hefe Zwei-Hybrid
pGBT9-136ctges	<i>HCF136</i>	298-1203	GAACGGATCCGGGACATTGCTTTTCGTCCCC	CGTGCTGCAGTTATATCGGAGCAAGACTCC	Hefe Zwei-Hybrid
pGBT9-136ct1	<i>HCF136</i>	298-672	GAACGGATCCGGGACATTGCTTTTCGTCCCC	CGTGCTGCAGTTCTGAATAGCAGCTTTCC	Hefe Zwei-Hybrid
pGBT9-136ct2	<i>HCF136</i>	760-942	GAACGGATCCGGCGTTACCTGATGGAAG	CGTGCTGCAGTTGCTAAGATAAAGTCCTCC	Hefe Zwei-Hybrid
pGBT9-136ct3	<i>HCF136</i>	1033- 1203	GAACGGATCCGGGAAGCATGGGCAGCAGGA	CGTGCTGCAGTTATATCGGAGCAAGACTCC	Hefe Zwei-Hybrid
pcAt136-28	<i>HCF136</i>	/	/	/	Plastiden-Import
pBS-KS-ORF342	slr2034	-12-1105	AGAGAATTCCTGTTTACAATGCCTG	TACTCTCGAGGGAACCATTGCCACCTC	Plastiden-Import
pGAD424 (MCS)	/	/	CGATGATGAAGATACCCACC	GCTACGTGTCAACTTCACTTG	PCR, Sequenz.
pΔtatA	ssl2823	-364-17	TATGCGGCCCGCTGGCGAGACAATGCC	GACTCTAGATGCTCCTGGAGGGTC	Mutagenese
pΔtatA	ssl2823	170-457	AGGCTCGAGGCACTGAAGTAGTGG	CGCGAATTCATTCTGCCCGGATGG	Mutagenese
pΔtatB	slr1046	-407-74	TATGCGGCCCGCTCAGGACAGATCC	GCGAATTCGACTGTAGCAGAGC	Mutagenese
pΔtatB	slr1046	278-786	GAGCTCGAGTGAAACGGGAAGCCC	GACTCTAGATGCTCCTGGAGGGTC	Mutagenese

Tab.1 : In dieser Arbeit verwendete oder hergestellte Klone für Proteinexpression in *E. coli*, Beute-/Köder-Konstrukte für das Zwei-Hybrid-System in Hefe, Chloroplasten-Importexperimente oder Mutagenese in *Synechocystis*. Die dafür hergestellten Primer sind in 5' => 3' -Orientierung aufgelistet, die Schnittstellen für direkte Klonierung sind unterstrichen. Einige Primer wurden nur für PCR-Amplifizierung und Sequenzierung eingesetzt. Sämtliche Ziel-DNA stammte aus *Arabidopsis thaliana* (*HCF136*, psbA, psbD, psbD/F, psbH, hoxR) oder *Synechocystis spec.* (slr0339, slr2034, ssl2823, slr1046).

2.1.5 Antiseren

Antigen/Spezies	Hersteller/Referenz
PSI-A/B (PsaA/B) Spinat	G. Armstrong / K. Apel, ETH, Zürich, Schweiz
PSI-D (PsaD) / Spinat	R. Nechushtai, Hebrew University, Jerusalem, Israel
FNR / Spinat	R.B.Klösger, Universität Halle-Wittenberg
Plastocyanin / Spinat	?
PSII-CP47 (PsbB) / Spinat	U. Johannigmeier, Universität Bochum
PSII-CP43 (PsbC) / Gerste	J. Mullet, P. Gamble Texas A&M-University, USA
PSII-D2 (PsbD) / Gerste	J. Mullet, P. Gamble Texas A&M-University, USA
PSII-D1 (PsbA) / Gerste	J. Mullet, P. Gamble Texas A&M-University, USA
Cytb ₅₅₉ α (PsbE) / <i>Arabidopsis</i>	diese Arbeit
PSII-34kD-Protein (PsbO) / Spinat	R.B.Klösger, Universität Halle-Wittenberg
PSII-23kD-Protein (PsbP) / Spinat	R.B.Klösger, Universität Halle-Wittenberg
PSII-H (PsbH) / <i>Arabidopsis</i>	diese Arbeit / C. Driemel, Universität Düsseldorf
LHCII (CP29, CP24)	S. Berg
Cyt f / Mais	A. Barkan, University of Oregon, USA
Cyt b ₆ / Spinat	G.Hauska, Universität Regensburg
PetD / Spinat	R.J. Berzborn, Ruhr-Universität Bochum
HCF136 / <i>Arabidopsis</i>	diese Arbeit
HCF153 / <i>Arabidopsis</i>	K. Lennartz, Universität Düsseldorf
HCF164 / <i>Arabidopsis</i>	K. Lennartz, Universität Düsseldorf
Ycf39 (slr0339) / <i>Synechocystis</i>	diese Arbeit / C. Driemel, -Universität Düsseldorf

Tabelle 2: In dieser Arbeit verwendete Antiseren und Referenzen

2.1.6 Saatgut

Die Mutante *hcf136* stammte aus einer Kollektion T-DNA-mutagenisierter Pflanzen im Ökotypen *Wassilewskija* von *Arabidopsis thaliana* (Feldmann, 1991 und 1992). Zur Vereinzelung der T-DNA-Insertionen wurde *hcf136* mit Wildtyp-Pflanzen vom Ökotypen *Columbia* rückgekreuzt und die Nachkommen (F1) geselbstet. Geeignete Nachkommenlinien dieser Selbstungsgeneration (F2) mit eindeutiger Kosegregation von Mutation und Kanamycin-Resistenz wurden für diese Arbeit verwendet.

Saatgut der Ökotypen *Landsberg erecta* und *Columbia* wurde von Dr. J. Dangl (Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, Köln) bereitgestellt. Saatgut des Ökotypen *Wassilewskija* (Linien CS2223 und CS2260) stammte vom *Arabidopsis* Biological Resource Center (Ohio, USA).

Des weiteren wurde Saatgut von Spinat (*Spinacia oleracea* L. var. *Polka*) und Gerste (*Hordeum vulgare* L.) verwendet.

2.2. Pflanzenanzucht

2.2.1 Sterile Anzucht von *Arabidopsis thaliana*-Keimlingen auf MS-Medium

Saatgut von *Arabidopsis thaliana* wurde in Eppendorfgläsern fünf Minuten mit 5 % Dimanin (Bayer AG Leverkusen), 0.02 % Triton oberflächensterilisiert und anschließend mit sterilem Wasser viermal gewaschen. Anschließend wurden ca. 20-40 Samen mit einer Pipette auf Petrischalen mit MS-Medium (Murashige and Skoog, 1962) mit 4,7 g/l MS-Salze, 0.5 g/l MES/NaOH, pH 5.7, 0.3 % (w/v) Gelrite, 1 % (w/v) Saccharose und wahlweise 70 mg/l Kanamycin überführt, vereinzelt und das überschüssige Wasser abgesaugt. Falls nur Wildtyp-Saatgut oder HCF136-Überexpressionslinien zur Etiolierung angezogen werden sollten, wurde auf Saccharose verzichtet und ca. es wurden 100-200 Samen pro Platte ausgelegt. Die Platten wurden mit Parafilm umschlossen, zur Synchronisation der Keimung für 48-60 h bei 4°C aufbewahrt und anschließend in einen Anzuchtschrank bei 23° C in einem 16 h / 8 h Licht-/Dunkelrhythmus und einer Photonenflußdichte von 50-70 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (Lumilux L36W/11-Lampen, Osram, Berlin) kultiviert. Zur Anzucht von *Arabidopsis*-Keimlingen unter sehr schwachen Lichtintensitäten (2-5 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) wurden die Platten zu $\frac{3}{4}$ der Oberfläche mit lichtdichter Folie abgedunkelt, die dabei noch in den Innenraum durchgelassenen Lichtintensitäten wurden gemessen (Quantum Photometer Modell LI-250, LI-COR, Lincoln, USA).

2.2.2 Etiolierung von *Arabidopsis*-Keimlingen

Zur Etiolierung von *Arabidopsis*-Keimlingen wurde das Saatgut auf MS-Medium nach der Kältesynchronisation zunächst für 24 Stunden unter den oben beschriebenen Anzuchtbedingungen mit Belichtung inkubiert, um die Keimung zu induzieren. Nach 24 h konnte man bei ca. 70 % der Samen die Wurzelspitze aus der Samenschale austreiben sehen. Die Platten wurden nun verdunkelt und unter den gleichen Anzuchtbedingungen für 120 Stunden etioliert.

2.2.3 Anzucht von *Arabidopsis thaliana* auf Erde

Zur Anzucht auf Komposterde (Floraton Nr. 1, Floragard, Oldenburg) wurden *Arabidopsis*-Pflanzen in einer Anzuchtkammer bei einer konstanten Temperatur von 20°C und 70% Luftfeuchtigkeit im 16h/8h-Licht-/Dunkelrhythmus angezogen. Die Kombination von Leuchtstoffröhren (FluoraL58W/77 und Natura de Luxe L58W/76, Osram, Berlin) lieferte eine Photonenflußdichte von ca. 80 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Für die Samenproduktion wurden die Pflanzen in Aracon-Multiplatten (Arasystems, Gent, Belgien) angezogen.

2.2.4 Anzucht von Spinat im Gewächshaus

Spinat wurde im Gewächshaus unter zusätzlicher Beleuchtung mit Quecksilber und Natrium-Hochdrucklampen (HDK 102-400 IK und SGR-K 200-400 IK, Philips, Hamburg) bei einer Photonenflußdichte von ca. 300 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ und einem Licht-/ Dunkelrhythmus von 12h/12h angezogen.

2.2.5 Etiolierung von Spinat und Gerste

12 Stunden vorgequollenes Spinat- und frisches Sommer-Gerste-Saatgut wurde auf sehr feuchter Komposterde (Floraton 1, Floragard, Oldenburg) dicht ausgesät, mit einer dünnen Schicht Erde abgedeckt und in einer Dunkelanzuchtkammer bei 25°C und 85% Luftfeuchtigkeit etioliert. Spinatblätter wurden dabei nach 5-7 Tagen geerntet oder die Pflanzen wurden in eine Lichtanzuchtkammer mit den oben angegebenen Bedingungen überführt. Etiolierte Gerste wurde nach 4-5 Tagen geerntet.

2.2.6 Anzucht von grüner Gerste in der Anzuchtkammer

Gerste wurde wie oben beschrieben auf Komposterde ausgesät und für 6 Tage in eine Lichtanzuchtkammer überführt.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Amplifizierung von DNA mit der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) (Saiki, 1988; Faloona *et al.*, 1987) wurden DNA-Fragmente aus Plastiden-DNA, genomischer DNA von *Synechocystis spec.* PCC6803 (freundlicherweise von K. Steinmüller zur Verfügung gestellt) oder aus Plasmid-DNA amplifiziert. Eine Zusammenfassung aller in dieser Arbeit verwendeten Primer ist in Tabelle 1 enthalten. Sollten Fragmente nach der Amplifizierung kloniert werden, wurden Primer eingesetzt, die an ihren 5'-Enden Überhänge mit geeigneten Restriktionsschnittstellen besaßen. Dadurch war eine gerichtete Klonierung möglich. Für analytische PCR wurde Taq-Polymerase (QBiogene, Illkirch, Frankreich) eingesetzt. Für Klonierungszwecke wurde auf KlenTaq-Polymerase (Clontech, Palo Alto, USA) oder Pfu-Polymerase (Stratagene, Heidelberg) zurückgegriffen. Grundsätzlich wurden die im Reaktionsmix enthaltenen Komponenten in folgenden Konzentrationen eingesetzt: 1 x Reaktionspuffer nach Herstellerangaben, Primer jeweils 1 µM, dNTP-Mix (TaKaRa Biochemicals, Heidelberg oder MBI Fermentas, St. Leon-Rot) 200 – 250 µM, Template-DNA 50-200 ng genomische DNA oder 2 ng Plasmid-DNA, Polymerase-Enzym: 1 U). Die Amplifizierungen wurden in 20-50 µl Gesamtvolumen in einem PCR-Gerät PE Gene Amp PCR System 9700 (Perkin Elmer Applied Biosystems, Langen) durchgeführt. Die Temperaturprofile richteten sich nach den Primer-Eigenschaften und Vorgaben des Polymerase-Herstellers. Normalerweise wurden 30-35 Reaktionszyklen durchgeführt.

2.3.2 Klonierung von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente wurden nach Standardmethoden (Sambrook *et al.*, 1989) über Phenol-Chloroform-Extraktion und Präzipitation mit Isopropanol oder Ethanol aufgereinigt, mit Restriktionsenzymen nach Angaben des Herstellers geschnitten (alle Enzyme von Roche Diagnostics, Mannheim oder MBI Fermentas, St. Leon-Rot), gelelektrophoretisch auf Agarosegelen aufgetrennt und mit Hilfe des JetSorb-Reagenziensatzes (Genomed, Bad Oeynhausen) aus Agarosegelen aufgereinigt. Ligationen von DNA-Fragmenten in Plasmide erfolgten mit Hilfe des Ligations-Reagenziensatzes von MBI Fermentas nach Angaben des Herstellers.

2.3.3 Herstellung und Anzucht von rekombinanten *E. coli* DH5 α -Klonen

Gefrierkompetente *E. coli* DH5 α -Bakterien wurden mit Hilfe der Hitzeschock-Methode (Hanahan, 1991) mit Plasmid-DNA transformiert. Positive Klone wurden auf LB-Medium (10 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Hefe-Extrakt, 10 g/l NaCl, pH 7.2) mit Antibiotikazusatz (100 mg/l Ampicillin oder 50 mg/l Ampicillin + 25 mg/l Kanamycin oder 50 mg/l Ampicillin + 12.5 mg/l Chloramphenicol) selektioniert und in Flüssigkultur mit den gleichen Zusätzen angezogen.

2.3.4 Plasmidisolation

Plasmid-DNA wurde aus Minikulturen nach der Methode von Holmes und Quigley (1981) isoliert, aus größeren Kulturen mit Hilfe der JetStar-Säulen (Genomed, Bad Oeynhausen) aufgereinigt. Die mit Hilfe der Säulen isolierte Plasmid-DNA wurde zum Sequenzieren bei der Firma AGOWA, Berlin verwendet.

2.3.5 Mutagenese von *Synechocystis spec.* PCC6803

2.3.5.1 Herstellung von Deletionskonstrukten der *tatA* und *tatB*-Gene von *Synechocystis spec.* PCC6803

Die 5'- und 3'-Bereiche der Gene *tatA* und *tatB* (*ssl2823*, *slr1046*) aus *Synechocystis spec.* wurden mit den in Tabelle 1 angegebenen Primern über PCR amplifiziert und für eine Klonierung vorbereitet. Resistenzkassetten zur bakteriellen Selektion mit Kanamycin bzw. Chloramphenicol wurden aus den Plasmiden pKS-KanaR bzw. pKS-CamR (freundlicherweise von K. Steinmüller zur Verfügung gestellt) herausgeschnitten und aufgereinigt. Die beiden *tatA*-Fragmente und die Chloramphenicol-Resistenzkassette sowie geschnittene und aufgereinigte pBluescript KS-DNA wurden in einer Vierfachligation in der gewünschten Reihenfolge vereinigt und kloniert. Das entsprechende galt für die Fragmente des *tatB*-Gens und der Kanamycin-Resistenzkassette. Positive Klone wurden zur Kontrolle sequenziert. Insgesamt ersetzt die Chloramphenicol-Resistenzkassette in Δ *tatA* einen zentralen Bereich von 51 Aminosäuren und die Kanamycin-Resistenzkassette in Δ *tatB* einen zentralen Bereich von 68 Aminosäuren. Jeweils 10 μ g Plasmid-DNA wurden mit NotI linearisiert, Phenol-/Chloroform-aufgereinigt und mit Isopropanol präzipitiert. Anschließend wurde die DNA getrocknet und in sterilem TE-Puffer rückgelöst. Sie war jetzt vorbereitet für die Transformation von *Synechocystis spec.*

2.3.5.2 Transformation von *Synechocystis spec.* PCC6803

Die Anzucht und Transformation von *Synechocystis spec.* PCC6803 mit den *tat*-Deletionskonstrukten wurde nach einer Vorschrift von K. Steinmüller (1995) durchgeführt. Das dabei verwendete Standardmedium war BG11-Medium (Sigma, München), wobei diesem Medium noch 1.1 g/l HEPES zugesetzt wurde, der pH-Wert wurde dann auf 7.3 titriert. Die Transformationsprozedur wurde von K. Schult im Rahmen eines Laborpraktikums durchgeführt.

2.3.6 Gerichtete Mutagenese zur Herstellung eines durchgehenden psbE/F-Leserasters

Die gerichtete Mutagenese im psbE/F – Cluster von Plastiden-DNA aus *Arabidopsis thaliana* wurde mit dem Ziel durchgeführt, das Stopcodon zwischen beiden Genen zu ersetzen und so ein durchgehendes Leseraster für die Verwendung im Zwei-Hybrid-System der Hefe zu schaffen (vgl. McNamara *et al.*, 1997). Die Mutagenese erfolgte mit Hilfe von PCR unter Verwendung der Primer-Überhang-Methode) Dazu wurden die in Tabelle 1 angegebenen Primer verwendet. Durch Verwendung des Mutagenese-Primers und des in der Tabelle aufgelisteten Rückprimers wurde in einer PCR mit Taq-Polymerase (QBiogene, Illkirch, Frankreich) ein Fragment von 78 bp erzeugt, bei dem das "TAG" (Stop) an Position 250 in ein "CAG" (Glutamin) ersetzt wurde. Dieses Fragment wurde aufgereinigt und einer zweiten PCR (ebenfalls mit Taq-Polymerase) als Rück-Primer zur Herstellung eines psbEF-Gesamtkonstruktes mit durchgehendem Leseraster eingesetzt.

2.3.7 Komplementation der Mutante *hcf136* über Wurzeltransformation

Für die Transformation wurden homozygot-mutante *hcf136*-Keimlinge eingesetzt. Die Mutante *hcf136* wurde ursprünglich zur Vereinzelung der T-DNA-Insertionen mit Wildtyp-Pflanzen vom Ökotypen *Columbia* rückgekreuzt, die Nachkommen (F1) geselbstet und die Nachkommen dieser Selbstungsgeneration (F2) auf die Aufspaltung der Mutation und Kanamycin-Resistenz hin untersucht. Drei Nachkommenlinien, die eindeutig 1:3 bezogen auf Mutation und Kanamycin-Resistenz aufspalteten, wurden für die Transformation eingesetzt, da hier die Mutation mit der T-DNA-Insertion gekoppelt zu sein scheint. Saatgut dieser Linien wurde wie oben beschrieben oberflächensterilisiert und auf SG-Medium (Koncz *et al.*, 1994) ausgelegt. Nach 14 Tagen konnten die Mutanten aufgrund ihres bleicheren Phänotyps bzw. ihrer unter UV-Licht erkennbaren Hoch-Chlorophyll-Fluoreszenz identifiziert und auf neue Platten überführt werden. Die Petrischalen wurden schräg justiert, damit die Wurzeln parallel nach unten und nur auf der Oberfläche des Mediums wuchsen.

Für die Transformation wurde die vollständige cDNA von *HCF136* aus pcAt-HCF136 unter Kontrolle des 35S-Promotors in den Pflanzenexpressionsvektor pPCV91 (Strizhov *et al.* 1996) kloniert. Als Negativkontrolle für die Komplementation diente der pPCV91-Vektor ohne Fremd-DNA-Insertion. Konstruktherstellung, Transformation und Anzucht des Agrobakteriumstammes GV3101 (pMK90RK) wurden in der Diplomarbeit (Plücken, 1997) ausführlich beschrieben.

Die Transformation der Wurzelstücke erfolgte wie in Koncz *et al.* (1994) beschrieben, wobei zwei Abwandlungen vorgenommen wurden: Die Selektion der transgenen Wurzelstücke wurde mit 10 statt 15 mg/l Hygromycin durchgeführt und zur Regeneration der Wurzeln an den Sprossen wurde auf eine Behandlung mit SE-Medium verzichtet und statt dessen nach 2 Monaten das SG-Medium mit 2 mg/l Indolylessigsäure (Auxin) versetzt. Wurzelinduktion konnte daraufhin nach 2-3 Wochen beobachtet werden.

Die Sprosse mit Wurzeln wurden dann auf Erde umgesetzt und in der Anzuchtkammer über zwei Wochen schrittweise an 70 % Luftfeuchtigkeit gewöhnt. Die so regenerierten 13 unabhängigen Pflanzenlinien wurden zur Blütenbildung und Samenreife gebracht und das Saatgut bei Raumtemperatur gelagert. Zur Herstellung von Linien, die homozygot für das transformierte Expressionskonstrukt sind, wurden die Linien erneut geselbstet und die Nachkommen auf Mutantenaufspaltung hin untersucht.

2.3.8 Suche nach Interaktoren von HCF136 mit Hilfe des Zwei-Hybrid-Systems der Hefe

Das Zwei-Hybrid-System der Hefe basiert auf der Tatsache, daß viele eukaryotische Transkriptionsfaktoren aus zwei funktionell unabhängigen und physikalisch trennbaren Domänen bestehen. Diese Regulatoren enthalten eine DNA-Bindedomäne, die an eine spezifische "Enhancer"-artige "UAS"-Sequenz ("upstream activating sequence") bindet und eine Aktivierungsdomäne, die den RNA Polymerase II - Komplex zur Transkription eines Gens stimuliert. Sowohl die DNA-Bindedomäne als auch die Aktivierungsdomäne werden zur Transkription eines Gens benötigt und sind normalerweise, wie auch im Fall des nativen Gal4p Teile desselben Proteins. Werden beide Teile voneinander getrennt und in der Hefe gleichzeitig zur Expression gebracht, findet normalerweise keine Interaktion zwischen beiden Domänen statt und somit erfolgt auch keine Transkriptionsaktivierung des zugehörigen Gens. Werden dagegen beide Teile als Hybridproteine mit interagierenden Proteindomänen zur Ko-Expression gebracht, so kann wieder die Transkriptionsaktivierung des zugehörigen Gens stattfinden.

In dieser Arbeit wurde eine Kombination von Matchmaker Two Hybrid-System I und II- der Firma Clontech (Palo Alto, USA) verwendet, basierend auf dem Gal4p-Transkriptionsaktivator der Hefe. Die Sequenz der DNA-Bindedomäne lag im Hefektor pGBT9 vor, in dem der DNA-Abschnitt des Köderproteins (hier: HCF136-Proteinabschnitte) im Leserahmen fusioniert wurde. Der Vektor pGAD10 (bzw. pGAD424) enthielt die Sequenz der Aktivator-domäne, hinter der im Leserahmen der DNA-Abschnitt des Beuteproteins ligiert wurde. Die Interaktion wurde im Hefestamm PJ69-4A getestet. Dieser Stamm besitzt Deletionen in den Genen zur Aminosäuresynthese HIS3, LEU2, TRP1 und ADE2. Des Weiteren sind die Gene GAL4 und GAL80 deletiert. Ein GAL1-UAS-GAL1-TATA-Konstrukt wurde vor ein HIS3-Reportergen im Kerngenom verankert. Ferner wurde ein GAL2-UAS-GAL2-TATA-Konstrukt vor ein ADE2-Reportergen im Kern inseriert. Der Stamm trägt den Paarungstyp Mat a. Zur Untersuchung auf direkte Interaktion zweier Proteine wurden die beiden Vektoren über Hefetransformation nach der Lithiumacetat / PEG-Methode nach Angaben des Herstellers in den Stamm PJ69-4A transformiert.

Beim Sichten der DNA-Banken aus *A. thaliana* wurde das Köderplasmid zunächst in den Stamm PJ69-4A transformiert, während das Beuteplasmid mit den verschiedenen Bank-Klonen in den Stamm Y187 transformiert wurde. Dieser Stamm besitzt den Paarungstyp Mat α . und trägt Deletionen in den gleichen Aminosäuresynthese-Genen wie PJ69-4A. Beide Hefestämme wurden durch Kreuzung nach Vorgaben des Herstellers vereinigt und diploide Zellen wurden durch Selektion auf SD-Medium ohne Leucin und Tryptophan selektioniert. Die Selektion von Klonen mit Interaktion erfolgte über 3 Wochen Inkubation bei 30°C auf SD-Medium ohne Leucin, ohne Tryptophan und ohne Histidin (mit Zusatz von 5 mM 3-Amino-1.2.4-triazol, einem kompetitiven Inhibitor von Histidin) oder auf SD-Medium ohne Leucin, ohne Tryptophan und ohne Adenin. Die Kontrolle positiver Klone erfolgte durch reziproke Selektion. Die Isolation von Plasmid-DNA aus den positiven Hefeklonen erfolgte nach einer modifizierten Alkali-Lyse-Methode (Birnboim und Doly, 1979), wobei eine Vorinkubation der Hefezellen in 50 mM Na₂HPO₄, 50 mM KH₂PO₄, pH 7.5, 25 mM EDTA, 1% (v/v) 2-Mercaptoethanol mit 5 U Lyticase (Sigma-Aldrich, München) durchgeführt wurde. Aus dieser Plasmid-DNA wurde die Sequenz des Köderproteins mit Primern außerhalb der multiplen Klonierungsstelle des Plasmids pGAD10 bzw. pGAD424 amplifiziert und in pBluescript KS mit Hilfe von *E. coli* DH5 α kloniert. Anschließend wurden die DNA-Abschnitte sequenziert. Direkt isolierte Beuteplasmide wurden zusammen mit leerem pGBT9-Vektor zurück in Zellen des Hefestammes PJ69-4A transformiert

und auf Selektionsmedium wurde kontrolliert, ob das Beuteprotein alleine die Transkription des Reportergens stimuliert (Eigenaktivierungstest).

2.3.8.1 Sichtung einer *Arabidopsis thaliana* cDNA-Bank

Eine bei der Firma Clontech kommerziell erhältliche cDNA-Bank von *Arabidopsis thaliana* für das Zwei-Hybrid-System der Hefe wurde freundlicherweise von PD T. Lisowsky zur Verfügung gestellt. Folgende Daten kennzeichnen die Bank: Die cDNA wurde aus mRNA aus Blattgewebe von drei Wochen alten *Arabidopsis thaliana* – Keimlingen hergestellt. Dabei wurde sowohl ein Oligo-dT-Primer-Gemisch als auch ein Gemisch an Zufalls-Hexamerprimern für die Reverse Transkription eingesetzt. Die Bank sollte nach Angaben des Herstellers mindestens 3.0×10^6 unabhängige cDNA-Klone enthalten. Die durchschnittliche Insertgröße betrug 1.2 kb, wobei ein Größenbereich von 0.6-4.0 kb abgedeckt wurde. Schon vom Hersteller wurde diese Bank einmal in *E. coli* DH5 α amplifiziert. Zur erneuten Massentransformation der Plasmid-DNA in den Hefestamm Y187 wurde die Bank in *E. coli* DH5 α ein weiteres Mal amplifiziert (Wachstum über Nacht bei 28° C in 500 ml LB-Medium mit 50 mg/l Ampicillin), die Plasmid-DNA über Säulenaufreinigung (Plasmid MegaPrep, Qiagen, Hilden) isoliert und je 500 μ g DNA wurden in transformationskompetente Y187-Zellen transformiert. Die Transformationsprozedur sowie die Herstellung von Stammkulturen erfolgte nach Vorgaben des Herstellers Clontech. Bei der Kreuzung zur Herstellung diploider Hefen mit Köder und Beuteploid wurden 1.73×10^8 cfu Y187-Hefezellen mit 6.3×10^9 cfu PJ69-4A-Hefezellen zusammengebracht und lieferten 2.1×10^7 cfu diploide Hefen, was einer Kreuzungsrate von 12.4 % entspricht. Die Gesamtzahl der auf Interaktion gesichteten diploiden Hefen betrug 2.1×10^7 cfu und sollte damit die gesamte cDNA-Bank von *Arabidopsis thaliana* mehrfach abdecken, sofern bei den Amplifizierungen keine Klone verloren gegangen sind. Diese Arbeiten wurden von K. Lennartz, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt.

2.3.8.2 Herstellung einer Plastidenbank für das Zwei-Hybrid-System und anschließende Sichtung mit HCF136 als Köderprotein

Der Grundgedanke bei der Erstellung der Plastidenbank war es, möglichst kleine Fragmente zu klonieren. Die möglichen Interaktionspartner von HCF136, nämlich Komponenten des PSII-Kernkomplexes, sind integrale Membranproteine, die als ganze Proteine nicht in der Hefe erfolgreich exprimiert bzw. in den Kern transportiert werden können. Bei möglichst kleinen Fragmenten ist die Wahrscheinlichkeit am größten, DNA-Sequenzen für weitgehend hydrophile Proteinabschnitte im Leserahmen zu klonieren. Diese enthalten dann auch die luminalen Extensionen der Membranproteine, die am ehesten mit HCF136 interagieren sollten.

Plastiden-DNA aus *Arabidopsis thaliana* wurde nach einem Protokoll von S. Felder (1999) isoliert und für die Klonierung in den Vektor pGAD424 wie folgt bearbeitet: Einerseits wurden 5 μ g Plastiden-DNA in TE-Puffer (10 mM Tris/HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA) in einer Konzentration von 25 ng/ μ l 10 x mit Hilfe des Branson Sonifier (Danbury, USA) bei Stufe 1-2 beschallt. Zwischendurch wurde die Lösung zentrifugiert und auf Eis gekühlt. Die entstandenen DNA-Fragmente lagen in einem Größenbereich von 100 – 800 bp mit einem Maximum um 350 bp. Diese DNA wurde anschließend mit Hilfe der T4-DNA-Polymerase (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) zur Herstellung glatter Enden 30 min bei 37° C inkubiert. Dabei wurden im Reaktionsgemisch ein dNTP-Mix mit einer Konzentration von 0.5 mM für jedes Nukleotid eingesetzt, um Polymerase- und Exonuklease-Funktion des Enzyms im Gleichgewicht zu

halten. Es folgte eine Phenol-/ Chloroform-Extraktion und Fällung der DNA sowie eine anschließende Gelaufreinigung der Fragmente mit Hilfe des JetSorb-Reagenziensatzes. Auf der anderen Seite wurden je 1 µg ptDNA mit den Restriktionsenzymen RsaI, AluI und Sau3AI nach Standardprotokoll geschnitten. Diese Restriktionsenzyme erkennen DNA-Sequenzmotive von vier Basen und liefern nach Restriktion des Plastoms von *A. thaliana* 357, 485 bzw. 514 Fragmente mit einer Durchschnittsgröße von 300 bp. RsaI und AluI lieferten Fragmente mit glatten Enden, Sau3AI lieferte Enden, die kompatibel mit BamHI-geschnittener Vektor-DNA waren. Der Vektor pGAD424 wurde mit dem Restriktionsenzymen SmaI bzw. BamHI geschnitten und die Vektorenden wurden anschließend mit alkalischer Phosphatase (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Herstellervorgaben desphosphoryliert. Die Vektor-DNA wurde anschließend über Phenol-/Chloroform-Extraktion und Isopropanol-Fällung aufgereinigt. Die Ligation der durch Ultraschall gesicherten bzw. mit Hilfe von Restriktionsenzymen geschnittenen ptDNA in pGAD424 erfolgte mit Hilfe des Ligations-Reagenziensatzes von MBI-Fermentas nach Herstellerangaben, wobei für die Ligation von DNA mit glatten Enden dem Ligationsansatz ad 5% PEG4000 zugesetzt wurde. Die Ligationsansätze wurden in selbst hergestellte gefrierkompetente *E. coli* DH5α -Zellen bzw. in gefrierkompetente *E. coli* XL1-Blue-Zellen über die Hitzeschock-Methode (Hanahan, 1991) transformiert und die gesamten Transformationsansätze wurden auf LB-Platten mit 100 mg/l Ampicillin ausplattiert. Die Qualität der so erstellten Bank wurde durch Kolonie-PCR mit Primern außerhalb der multiplen Klonierungsstelle von pGAD424 getestet. Ausgehend von einer Plastomgröße in *A. thaliana* von 154.000 bp und einer angestrebten Fragmentgröße von 200-300 bp decken 500-800 verschiedene Fragmente das Plastom einmal ab. Um sicherzustellen, daß alle Klone bei der nichtdirektionalen Klonierung wenigstens einmal im korrekten Leserahmen in der Bank enthalten sind, war eine Klonzahl von 18.500-28.000 nötig. Insgesamt sind aus der gesicherten ptDNA 25.300 Klone hervorgegangen. Jeweils 8.000, 10.000 bzw. 6.000 Klone sind aus der Restriktion der ptDNA mit RsaI, AluI und Sau3AI hervorgegangen. Die Zahl der Klone mit ptDNA-Insertion lag bei über 90%. Die Kolonien auf den Selektionsplatten wurden ab gespült und bei 37° C in flüssigem LB-Medium mit 100 mg/l Ampicillin für 3-5 Stunden bei 220 rpm geschüttelt. So wurde ein gleichmäßiges Hochwachsen der amplifizierten Plasmidbank gewährleistet. Die Plasmid-DNA wurde anschließend mit JetStar-Säulen (Genomed, Bad Oeynhausen) isoliert und wie oben beschrieben in Zellen des Hefestammes Y187 transformiert. Die Sichtung der Plastidenbank mit dem vollständigen HCF136-Protein ohne Transitsequenz als Köder erfolgte wie bereits oben beschrieben. Bankerstellung und Sichtung der Plastidenbank wurden von K. Schult im Rahmen eines Laborpraktikums durchgeführt.

2.3.8.3 Untersuchungen auf direkte Interaktion

Bei der Untersuchung auf direkte Interaktion von HCF136 mit Proteinen des PS II-Reaktionszentrums wurden jeweils hydrophile Peptidabschnitte der PS II-Proteine in den Vektor pGAD424 kloniert, die nach bisherigem Kenntnisstand in den Thylakoidinnenraum (Lumen) ragen (s. Tabelle 3). Außerdem wurde der hydrophile Abschnitt von Rubredoxin aus *A. thaliana* in gleicher Absicht in pGAD424 kloniert. Zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung stand die Topologie von Rubredoxin in der Membran noch nicht fest. Das Protein wurde deswegen auf direkte Interaktion getestet, da sich das Gen bei Cyanobakterien und bei *Cyanophora paradoxa* jeweils stromaufwärts vom Ycf48-Gen befindet und somit ein Funktionszusammenhang möglich ist. Für alle direkten Interaktionsversuche wurde als Köderkonstrukt das vollständige HCF136-Protein ohne Transitsequenz im Vektor pGBT9 eingesetzt. Ferner wurden Teilabschnitte von

HCF136 in pGAD424 kloniert und diese Konstrukte wurden zur Untersuchung auf Interaktion mit dem vollständigen HCF136-Protein in pGBT9 verwendet, um so eine Interaktion von HCF136 mit sich selbst zu überprüfen.

Klon	Gen	Protein	AS-Pos.	Beschreibung
pGAD424-psbA	psbA	PSII-D1	308-353	luminaler hydrophiler C-Terminus vom PSII-D1-Protein
pGAD424-psbD	psbD	PSII-D2	295-353	luminaler hydrophiler C-Terminus vom PSII-D2-Protein
pGAD424-psbE	psbE/F	Cytb559 α	45-84	luminaler hydrophiler C-Terminus vom PsbE-Protein
pGAD424-psbEF	psbE/F	Cytb559 α/β	45-100	Fusion aus luminalem hydrophilen C-Terminus von PsbE + hydrophilen Aminoterminus von PsbF (lt. McNamara <i>et al.</i> , 1997 luminal); Stopcodon zwischen beiden Genen wurde durch Punktmutation in Glutamin umgewandelt
pGAD424-hoxR	hoxR	Rubredoxin	87-175	HoxR ohne Membrananker am C-Terminus
pGBT9-136ges	<u>HCF136</u>	HCF136	78-403	komplettes HCF136 ohne Transitsequenz
pGBT9-136ctges	<i>HCF136</i>	HCF136	100-401	komplettes HCF136 ohne Transitsequenz und hydrophobem Abschnitt am Aminoterminus
pGBT9-136ct1	<i>HCF136</i>	HCF136	100-224	1. Teilabschnitt von 136-ctges-Y2H
pGBT9-136ct2	<i>HCF136</i>	HCF136	254-314	2. Teilabschnitt von 136-ctges-Y2H
pGBT9-136ct3	<i>HCF136</i>	HCF136	345-401	3. Teilabschnitt von 136-ctges-Y2H

Tabelle 3: Konstrukte für direkte Interaktions-Tests im Hefe-Zwei-Hybrid-System

Die Plasmidpaare wurden jeweils durch Doppeltransformation in den Hefestamm PJ69-4A gebracht. Dabei wurden jeweils 100 ng Plasmid-DNA eingesetzt. Die Transformation der Hefen wurde von K. Lennartz, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt.

2.3.9 Computerunterstützte Sequenzanalysen

Zur computerunterstützten Sequenzanalyse von DNA- und Proteinsequenzen (Restriktionsanalysen, Leseraster-Erkennung, Übersetzung in Aminosäuresequenzen, Hydropathieberechnungen (Eisenberg *et al.*, 1984), Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung) wurde das Programm MacMolly Tetra (SoftGene GmbH; Schöneberg *et al.*) verwendet.

Um zu einer gegebenen Nuklein- oder Aminosäuresequenz ähnliche Sequenzen zu finden, wurde der BLAST-Server (BLAST = Basic Local Alignment Tool; www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/, Altschul *et al.*, 1994) vom National Center for Biotechnology Information (Bethesda, USA) benutzt. Sequenzinformationen von *Synechocystis spec.* PCC6803 wurden teilweise auch direkt vom Cyanobase-Server (www.kazusa.or.jp/cyanobase/) bezogen. Zum Auffinden von bekannten Motiven in Aminosäuresequenzen wurden die Protein-Analyse-Programme vom ExpASY-Server (ExpASY = Expert Protein Analysis System; www.expasy.ch/, Appel *et al.*, 1994) des Swiss Institute of Bioinformatics eingesetzt. Hier ist insbesondere das Programm "PROSITE" (Hofmann, 1999, Bucher & Bairoch, 1994) zu nennen. Sequenzvergleiche ("Alignment") wurden mit Hilfe des Programms "ClutalW 1.7" (Thompson, 1994) durchgeführt.

2.4 Pflanzenphysiologische Methoden

2.4.1 Chlorophyll-Fluoreszenz-Induktionsmessungen

Die Chlorophyll a-Fluoreszenz von intakten Keimlingen oder Blattmaterial von *Arabidopsis thaliana* wurde bei Raumtemperatur mit Hilfe eines Pulsamplituden-Modulations-Fluorometers (PAM 101/103; FL 101, 101 ED, 101 F, Walz, Effeltrich) angeregt und gemessen (Schreiber, 1986, Schreiber *et al.* 1986; Krause & Weis, 1991). Die Auswertung der Fluoreszenzmessungen erfolgte nach der Nomenklatur von van Kooten und Snel (1990). Vor der Messung wurde das Pflanzenmaterial unter der Fiberoptik für 5 min. vorverdunkelt. Die Grundfluoreszenz wurde durch gepulstes Meßlicht angeregt (Taktfrequenz 1.6 kHz, Pulsdauer 1 μ s, Peakwellenlänge 650 nm, Photonenflußdichte 1 μ mol \cdot m⁻² \cdot s⁻¹). Ein sättigender Weißlichtpuls (PFD 6.000 μ mol \cdot m⁻² \cdot s⁻¹, Pulsdauer 200 ms) diente zur Ermittlung der maximalen Fluoreszenz F_m . Daraus konnte dann die variable Fluoreszenz $F_v = F_m - F_0$ sowie das Verhältnis F_v/F_m berechnet werden. Die Anregung der Photosynthese erfolgte durch aktinisches Licht.

2.4.1.1 Vergleichende Messungen Wildtyp-Mutante

Zum Vergleich von Wildtyp-Pflanzen und Mutanten wurden ganze Keimlinge im Alter von 14 Tagen auf sterilem MS-Medium gemessen. Bei diesen Messungen wurde aktinisches Licht mit einer PFD von 130 μ mol \cdot m⁻² \cdot s⁻¹ verwendet und die Einstellung des photosynthetischen Fließgleichgewichtes für eine Zeitdauer von 5 min verfolgt.

2.4.1.2 Chlorophyll-Fluoreszenzmessung bei 1.200 μ E aktinischem Licht

Im Falle der Chlorophyll-Fluoreszenz-Induktionsmessung bei einem aktinischem Licht von 1.200 μ mol \cdot m⁻² \cdot s⁻¹ wurden ganze Pflanzen im Alter von 10 Tagen auf Erde gemessen. Die Einstellung des photosynthetischen Fließgleichgewichtes wurde hier über 9 min verfolgt. Sättigende Weißlichtpulse während der Belichtungsphase dienten zur Bestimmung der photochemischen Fluoreszenzlöschung $qP = F_{st}/F_{vst}$, der nicht-photochemischen Fluoreszenzlöschung $qN = (F_m/F_{mst}) - 1$ und der Quantenausbeute des Photosystems II im stationären Zustand ($\Phi(PSII) = qP \cdot F_{vst}/F_{mst}$, Genty, 1989). Sättigende Weißlichtpulse während einer 5 minütigen Relationsphase in Dunkelheit dienten zur Bestimmung der energieabhängigen Fluoreszenzlöschung $qE = (F_m/F_{mst}) - (F_m/F_m')$ und der Löschung durch Photoinhibition $qI = (F_m/F_m') - 1$.

2.4.1.3 Chlorophyll-Fluoreszenzmessung von Keimlingen, die zuvor bei 2.000 μ E lichtgestresst worden sind

Bei der Messung von 10 Tage alten Keimlingen auf Erde, die zuvor bei 2.000 μ E und 4° C gestresst worden sind wurden 1-2 Blätter auf Objekträger gelegt, mit ausreichend Wasser benetzt und mit einem Objekträger abgedeckt. In diesem Fall wurde nur ein sättigender Lichtpuls verwendet, um das Verhältnis F_v/F_m während einer 100 minütigen Lichtstresphase bzw. in der Erholungsphase zu verfolgen.

2.4.2 Chlorophyll-Fluoreszenzuntersuchungen mit dem FluorCam-System

Das FluorCam-System 690 M (Photon System Instruments, Tschechien) besteht aus einem lichtdichten Kasten mit eingebauten CCD-Kamera und eignet sich dazu, Fluoreszenz-Messungen auf einer Fläche von ca. 12 x 12 cm durchzuführen. Auf diese Weise können mehrere Keimlinge gleichzeitig gemessen werden. Die Steuerung der Einheit erfolgte mit Hilfe eines Rechners und der zugehörigen Software PSI FluorCam Version 1.8. Das zur Verfügung stehende Modell enthielt eine Lichtquelle mit 635 nm Anregungslicht, die allerdings technisch bedingt nur eine Lichtintensität von maximal $350 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ erreichte, so daß eine echte F_m -Bestimmung nicht möglich war. Zur Bestimmung eines annähernden F_v/F_m -Verhältnisses wurde die Lichtintensität auf 100% (entspricht $350 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) gesetzt und eine Meßdauer von 5 Sek. gewählt. Um ein Maß für die Fluoreszenzlöschung zu erhalten, wurde die Intensität auf 50% eingestellt (entspricht $160 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) und eine Meßdauer von 5 min gewählt. *Arabidopsis*-Keimlinge wurden für diese Messungen in Petrischalen mit Erde ausgesät und im Alter von 10 Tagen verwendet. Nach guter Wässerung wurden die Pflanzen für 15 min bei 4° C gekühlt und dann für 30 min bei 4° C und $2000 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ gestreßt. Anschließend erfolgten die Messungen mit dem FluorCam-System bei RT. Zum Vergleich wurden die Pflanzen auch vor dem Streß und in der Erholungsphase gemessen.

2.4.3 HPLC-Auftrennung photosynthetischer Pigmente

Zur Auftrennung photosynthetischer Pigmente wurden 10-20 μl Thylakoidmembran-Suspension in 1 ml Aceton p.a. resuspendiert und für 10 min bei RT und 10.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde über einen 0.22 μm Sterilfilter filtriert und bis zur chromatographischen Auftrennung bei -20°C im Dunkeln aufbewahrt. Die Trennung der Pigmente erfolgte in Zusammenarbeit mit PD Dr. Jahns über Reversed-Phase-HPLC unter Verwendung einer LiChroCART 250-4-Säule (Trennungsmittel: LiChrospher 100 RP-18, 5 μm Partikelgröße, Merck, Darmstadt). Eine Vorsäule (LiChroCART 4-4) wurde zusätzlich verwendet. Die Anlage bestand im Wesentlichen aus der Pumpe L-7000, einem UV-Detektor L-7400, PC mit Integrationssoftware, Autosampler L-7200 (komplett von Hitachi / Merck, Darmstadt). Zum Eluieren der Pigmente wurde ein linearer Lösungsmittelgradient verwendet. Lösungsmittel A bestand aus Acetonitril, Methanol, Tris/NaOH, pH 8.0 in einem Verhältnis 87:10:3 (v/v/v). Für Lösungsmittel B wurde Methanol und Hexan in einem Verhältnis 4:1 (v/v) gemischt. Der Gradient umfaßte 0-9 min 100% Lösungsmittel A, 9-12.5 min linearer Gradient zu 100% Lösungsmittel B, 12.5-18 min 100% Lösungsmittel B. Die Durchflußrate betrug 2 ml/min, das Injektionsvolumen betrug 20 μl . Die eluierten Pigmente wurden bei 440 nm gemessen und anhand ihrer spezifischen Retentionszeit identifiziert.

Pigment	Retentionszeit (min)	Umrechnungsfaktor (Fläche / pmol Pigment)
Chlorophyllid a	1.7	1609
Neoxanthin	3.2	2772
Violaxanthin	4.2	3211
Antheraxanthin	6.3	2192
Lutein	9.3	2192
Zeaxanthin	10.3	2707
Chlorophyll b	13.3	1298
Chlorophyll a	13.9	1609
β -Carotin	17.1	2001

Tab. 4: Retentionszeiten der photosynthetischen Pigmente bei der HPLC und Umrechnungsfaktoren zur Konzentrationsbestimmung anhand der integrierten Peakflächen.

Die Pigmentkonzentrationen wurden anhand der integrierten Peakflächen und Umrechnungsfaktoren bestimmt, die durch Kalibrierung mit reinen Pigmenten ermittelt worden sind (Färber *et al.*, 1997). Chlorophyllid a wurde durch Auffangen des Eluats in den ersten 2 min und Messung eines Spektrums von 400-800 nm dieser Fraktion im Spektralphotometer identifiziert (charakteristische Maxima bei 432 und 662 nm, Almela, 2000).

2.5 Proteinbiochemische Methoden

2.5.1 Isolation von Gesamt-Membranproteinen aus *Arabidopsis thaliana*-Blattmaterial

Blattmaterial von 14-21 Tage alten auf MS-Medium gezogenen *Arabidopsis*-Keimlingen wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und mit Mörser und Pistill fein zerrieben. Das zerkleinerte Material wurde in 50 mM Tris/HCl, pH 6.8, 10 mM EDTA, 10 mM EGTA, 10 mM DTT, 1 mM PMSF und 1mM BAM bei 4° C resuspendiert und 15 min bei 10.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und Pellet, bestehend aus Gesamtmembranen und Zellwandbruchstücken in ca. 2 Volumen (bezogen auf das Pellet) desselben Puffers resuspendiert.

2.5.2 Isolation von Gesamt-Membranproteinen aus etiolierten *Arabidopsis*- und Spinat-Keimlingen

Bei etiolierten *Arabidopsis*-Keimlingen wurden ganze Pflanzen homogenisiert, bei Spinat dagegen nur die Blätter. Das Pflanzenmaterial wurde bei 4°C in einem kleinen Waring-Blendor-Aufsatz 4 x 5 Sekunden bei höchster Stufe in 50 mM Tris/HCl, pH 6.8, 10 mM EDTA, 10 mM EGTA, 10 mM DTT, 1 mM PMSF, 1mM BAM und 330 mM Sorbit zerkleinert. Alternativ wurde bei kleinen Mengen *Arabidopsis*-Material Mörser und Pistill eingesetzt. Das Homogenat wurde 15 min bei 10.000 rpm und 4°C zentrifugiert und das Pellet in ca. 2 Volumen Isolationspuffer ohne Sorbit resuspendiert.

2.5.3 Isolierung intakter Plastiden

Sämtliche Schritte zur Isolation intakter Plastiden wurden im Kaltraum bei 4° C mit vorgekühlten Geräten und Medien durchgeführt. Soweit nicht anders angegeben wurden Thylakoidfraktionen stets bei 4° C bearbeitet bzw. bei -70° C gelagert.

2.5.3.1 Isolierung intakter Plastiden aus Spinat und *Arabidopsis*

Zur Isolierung intakter Chloroplasten wurde Blattmaterial aus *Arabidopsis thaliana*, oder Spinat bei 4° C mit einem Waring-Blendor in Isolationsmedium, (330 mM Sorbit, 44 mM MES/NaOH, pH 6.1, 10 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM MnCl₂, 0.5 mM KH₂PO₄, 2 mM EDTA, 0.1% (v/v) 2-Mercaptoethanol) 3-5 Sek. bei voller Umdrehungszahl zerschnitten. Das Homogenat wurde durch 100 µm Gaze und 2 Lagen Miracloth filtriert. Das Filtrat wurde 120 Sek. bei 6.000 rpm und 4° C im GSA-Rotor (Sorvall- Kühlzentrifuge RC5B) zentrifugiert und das Pellet vorsichtig in Isolationsmedium resuspendiert. Die Suspension aus Chloroplasten und Chromatin wurde auf einen Percoll-Stufengradienten (85 % (v/v) Percoll, 2.55% (w/v) PEG6000, 0.85% (w/v) BSA, 0.85% (w/v) Ficoll bzw. 45 % (v/v) Percoll, 1.35% (w/v) PEG6000, 0.45% (w/v) BSA, 0.45% (w/v) Ficoll, jeweils in 330 mM Sorbit, 50 mM HEPES/KOH, pH 7.5, 2 mM EDTA, 1 mM MgCl₂, 0.03% (w/v) DTT) geladen und 10 min bei 8.000 rpm und 4° C im HB4-Ausschwingrotor zentrifugiert. Die untere Bande mit den intakten Plastiden wurde geerntet, in 330 mM Sorbit, 50 mM HEPES/KOH, pH 7.8 zwei mal mit dem dreifachen Volumen gewaschen und schließlich in 1-2 ml Puffer resuspendiert.

2.5.3.2 Isolierung intakter Plastiden aus Gerste

Die Isolierung intakter Chloroplasten oder Etioplasten erfolgte unter grünem Sicherheitslicht. Die Prozedur verlief im Wesentlichen analog zur Isolation bei Spinat, wobei folgende Änderungen vorgenommen wurden: Homogenisiert wurden die Plastiden in 400 mM Sorbit, 50 mM HEPES/KOH, pH 8.0, 2 mM EDTA, der Percoll-Stufengradient bestand aus 80 % (v/v) / 40 % (v)-Percoll in Isolationsmedium; die Waschung und Resuspendierung der Plastiden erfolgte in 400 mM Sorbit, 50 mM HEPES/KOH, pH 8.0. Die Zentrifugationen wurden bei 5.000 rpm für 3 min bzw. 10 min (Percoll-Stufengradienten-Zentrifugation), 4° C im HB4-Ausschwingrotor durchgeführt.

2.5.3.3 Plastidenzahlbestimmung

Zur Plastidenzahlbestimmung wurde je ein Aliquot mit Plastiden 1:500 und 1:1.000 verdünnt und die Zahl mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer (Tiefe: 0.2 mm; Großquadratfläche: 1 mm²) und einem Durchlichtmikroskop (Axiophot, Zeiss, Jena) mit 40fach Phasenkontrastobjektiv bestimmt. Bei Auszählung von vier Kleinquadraten galt folgende Formel (VF = Verdünnungsfaktor):

$$\text{Plastiden / } \mu\text{l} = \text{Zahl} \times 5 \times 4 \times \text{VF}$$

2.5.4 Chlorophyllbestimmung

2.5 – 10 µl Membransuspension aus Gesamtmembranen, intakten Plastiden oder Membranfraktionen wurden in je 1 ml 80% (v/v) Aceton resuspendiert und 5 min bei Raumtemperatur und 10.000 rpm zentrifugiert, um die Proteine zu pelletieren. Im Falle von etiolierten und belichteten

Arabidopsis-Keimlingen wurden 100 µl Gesamtmembranen in 400 µl Aceton p.a. aufgenommen und wie oben bearbeitet. Die Absorption des chlorophyllhaltigen Überstandes bei 645 und 663 nm wurde spektrophotometrisch gemessen und die Chlorophyllkonzentration nach Arnon (1949) berechnet: $c \text{ (mg/ml)} = 20.2 \times A_{645} + 8.02 \times A_{663}$

2.5.5 Proteinkonzentrationsbestimmung

Membranproteine wurden mit einem Volumen 20% (w/v) Octyl-β-D-glucopyranosid 5 min bei Raumtemperatur solubilisiert und 5 min bei 10.000 rpm, RT zentrifugiert. Etwa 2.5 –5 µl des Überstandes wurden zu 1 ml Bradford-Reagenz (0.01% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G250, 5% (v/v) Ethanol, 8% (v/v) Phosphorsäure) gegeben und nach Durchmischung wurde die Lösung 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde im Spektralphotometer die Absorption bei 595 nm gemessen (Bradford, 1976). Dabei wurden nur Absorptionswerte unterhalb 0.200 akzeptiert, ansonsten wurden Vorverdünnungen verwendet. BSA-Standardkonzentrationen im gleichen Absorptionsbereich dienten zur Konzentrationsbestimmung.

2.5.6 Isolierung von Thylakoiden und Stromaproteinen aus Spinat und *Arabidopsis*

Die intakten Chloroplasten wurden 1:20 in 10 mM HEPES/KOH, pH 8.0, verdünnt und zur osmotischen Lyse 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 5 min bei 6.000 rpm, 4° C, um die Thylakoide zu pelletieren. Der Überstand enthielt die löslichen Stromaproteine. Die Thylakoide wurden zweimal in je 20 Volumen Lysepuffer gewaschen, anschließend in wenig Lysepuffer resuspendiert und auf eine Konzentration von 1 mg Chlorophyll / ml eingestellt. Stromaproteine wurden mit 15 % (w/v) Trichloressigsäure auf Eis gefällt (vgl. Salzwäsche von Thylakoiden).

2.5.7 Fraktionierung von Spinat-Chloroplasten in Thylakoide und Hüllmembranen

Intakte Spinat-Chloroplasten wurden nach dem Protokoll von Cline *et al.* (1981) über einen Saccharose-Stufengradienten in Thylakoide und Hüllmembranen fraktioniert. Es wurden pro 14 ml-Zentrifugenröhrchen für den SW40Ti-Rotor 1 ml Chloroplasten entsprechend 500 µg Chlorophyll wie folgt vorbereitet: Die Plastiden wurden durch Zentrifugation pelletiert und vorsichtig in 1 ml 10 mM HEPES/KOH, pH 7.5, 2 mM EDTA mit 0,6 M Saccharose resuspendiert, 10 min auf Eis inkubiert und anschließend für 2 Stunden bei –20° C eingefroren. Die Suspension wurde bei Raumtemperatur ohne Durchmischung aufgetaut und dann mit einem Volumen 10 mM HEPES/KOH, pH 7.5, 2 mM EDTA mit 2 M Saccharose gemischt, so daß eine Endkonzentration von 1.3 M Saccharose vorlag. Diese Suspension wurde im Zentrifugenröhrchen mit einer Stufe aus 7 ml 10 mM HEPES/KOH, pH 7.5, 2 mM EDTA mit 1.2 M Saccharose und anschließend mit einer Stufe aus 4 ml 10 mM HEPES/KOH, pH 7.5, 2 mM EDTA mit 0.3 M Saccharose überschichtet. Es folgte eine Ultrazentrifugation bei 113.000 x g für 14 Stunden und 4°C. Die gelben Hüllmembranen bandierten nach dieser Zentrifugation im Übergang zwischen 1.2 M und 0.3 M Saccharose, während die Thylakoide pelletierten oder unmittelbar oberhalb des Bodens bandierten. Thylakoide wurden wie oben beschrieben pelletiert und gewaschen und dann in 10 mM HEPES/KOH, pH 8.0 resuspendiert. Die Hüllmembranen wurden mit 25 % PEG1500 für 30 min auf Eis gefällt und in der Ultrazentrifuge über Nacht bei 165.000 x g pelletiert. Der Überstand wurde quantitativ entfernt und das Pellet in

10 mM HEPES/KOH, pH 8.0 resuspendiert. Zur Überprüfung der Reinheit der Hüllmembranfraktion wurden eine Chlorophyllbestimmung und eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt.

2.5.8 Salzwäsche von sonifizierten Spinat-Thylakoiden

Spinat-Thylakoide wurden bei einer Konzentration von 50 µg Chlorophyll / ml in einem Gesamtvolumen von 13 ml in 10 mM HEPES/KOH, pH 8.0, 10 mM MgCl₂, 330 mM Sorbit, 2 mM PMSF und 2 mM BAM mit dem Branson Sonifier B12 (Danbury, USA) 3 mal für 15 Sek. auf Stufe 5 unter Eiskühlung beschallt. Dabei wurden 250 mM NaCl, 200 mM Na₂CO₃ (=> pH 11.3) oder 1 M CaCl₂ dem Medium zugesetzt bzw. es wurde zur Kontrolle ohne Salzzusatz sonifiziert. Die Beschallung diente dazu, daß auch luminal Proteine der Salzeinwirkung ausgesetzt wurden. Anschließend erfolgte eine Ultrazentrifugation bei 100.000 x g, 4°C, 2 Stunden (SW40Ti-Rotor), um die Membranvesikel zu pelletieren. Die Überstände wurden komplett abgenommen und die Membranpellets wurden in je 750 µl 10 mM HEPES/KOH, pH 8.0, 10 mM MgCl₂, 330 mM Sorbit, 2 mM PMSF und 2 mM BAM resuspendiert. Die abgelösten Proteine im Überstand der Ultrazentrifugation wurden mit 15 % (w/v) Trichloressigsäure 30 min auf Eis gefällt, für 30 min bei 10.000 rpm und 4°C zentrifugiert (SS34-Rotor) und die TCA-Pellets mit 80 % (v/v) Aceton gewaschen. Zuletzt wurden diese Pellets in je 750 µl Puffer fein dispergiert.

2.5.9 Thermolysin-Behandlung intakter und beschallter Spinat-Thylakoide

Die Protease Thermolysin wurde unmittelbar vor Gebrauch in einer Konzentration von 10 mg/ml in 10 mM HEPES/KOH, pH 8.0 und 10 mM CaCl₂ frisch angesetzt. Intakte Spinat-Thylakoide wurden bei einer Konzentration von 50 µg Chlorophyll / ml in einem Gesamtvolumen von 6 ml in 10 mM HEPES/KOH, pH 7.8, 10 mM MgCl₂, 330 mM Sorbit mit 0.1 mg/ml Thermolysin bei Raumtemperatur inkubiert (verändert nach Cline *et al.*, 1984). Nach 1, 2, 5, 10, 15, 20 und 30 min wurde je ein Aliquot von 500 µl entnommen und die Proteolyse durch Zugabe ad 50 mM EDTA und Eiskühlung gestoppt. Die Thylakoide wurden schließlich für 10 min bei 10.000 rpm und 4° C zentrifugiert, die Überstände verworfen und die Pellets in je 100 µl 10 mM HEPES/KOH, pH 8.0 resuspendiert. Zur Herstellung einer Mischung aus inside-out und rightside-out Vesikeln wurden 12 ml Spinat-Thylakoide bei einer Konzentration von 50 µg Chlorophyll / ml in 10 mM HEPES/KOH, pH 7.8, 10 mM MgCl₂, 330 mM Sorbit 3 mal für je 15 Sekunden mit dem Branson Sonifier B12 auf Stufe 5 unter Eiskühlung beschallt. 6 ml davon wurden wie die intakten Thylakoide mit Thermolysin inkubiert und die Reaktion zu den entsprechenden Zeitpunkten gestoppt. Anschließend wurden die beschallten Thylakoide 30 min bei 14.000 rpm und 4° C zentrifugiert, die Überstände wurden verworfen und die Pellets in je 100 µl 10 mM HEPES/KOH, pH 8.0 resuspendiert. Die 0-Kontrollen für intakte und beschallte Thylakoide wurden jeweils der entsprechenden Prozedur unterzogen, jedoch statt Thermolysin wurde nur Wasser zugegeben.

2.5.10 Fraktionierung von Thylakoidmembranen in Grana- und Stromathylakoide

Spinat-Thylakoide wurden in einem Phosphatpuffer mit Zusatz von Dextran-T500 und PEG4000 durch Ultraschall in Vesikel zerkleinert und diese dann durch Zentrifugation in einem wässrigen Zweiphasen-System ähnlicher Zusammensetzung in stroma- und granaangereicherte Fraktionen getrennt (Wollenberger *et al.*, 1994). Durch Wiederholung der

Trennprozedur wurde die Homogenität der Fraktionen gesteigert bzw. konnten auch Granarandbereiche isoliert werden. Diese Versuche wurden im Labor von Prof. Per Ake Albertson durchgeführt und Aliquots freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

2.5.11 Dichtegradienten-Zentrifugation von solubilisierten Gerste-(Pro-)Thylakoiden

2.5.11.1 Radioaktive Markierung von isolierten Plastiden

Die Proteinsynthese von isolierten Plastiden in Anwesenheit von ^{35}S -Methionin führte zur radioaktiven Markierung (*in organello*-Markierung) der neu synthetisierten plastidären Proteine. Die Methode wurde nach Eichacker *et al.* (1990) durchgeführt. Der Reaktionsansatz, in dem 10^8 Plastiden in einem Gesamtvolumen von 536 μl markiert wurden, enthielt 50 mM HEPES/KOH, pH 8.0, 400 mM Sorbit, 7 mM Magnesiumacetat, 118 mM Kaliumacetat, 10 mM DTT, 2mM ATP, 0.2 mM GTP (beides von Sigma-Aldrich, München), je 100 mM jeder Aminosäure mit Ausnahme von L-Methionin (Amino Acids Mixture minus Methionine, Promega, Madison, USA), 5.76 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Geranylgeraniolpyrophosphat (Sigma-Aldrich, München) zur Chlorophyll-Synthese und 350 μCi ^{35}S -Methionin (*in vivo* labelling grade, spez. Aktivität > 1000 Ci/mmol, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden). Die Markierung fand für Etioplasten und Chloroplasten 15 min in Dunkelheit (Vortranslation) und 15 im Licht bei 50 μE und 25°C statt. Anschließend wurden die Plastiden 5 min auf Eis gekühlt. Die Plastiden wurden durch Zentrifugation pelletiert (5.000 rpm, 1 min, 4°C), der Überstand verworfen und das Pellet in 500 μl 50 mM HEPES/KOH, pH 8.0, 400 mM Sorbit resuspendiert.

2.5.11.2 Solubilisierung von Gerste-(Pro-)Thylakoiden mit n-Dodecyl- β -D-maltosid

Alle folgenden Arbeiten wurden unter grünem Sicherheitslicht und auf Eis durchgeführt. Nach Isolation der intakten Plastiden wurden 1×10^8 Plastiden für radioaktive (*in organello* - Translation von Plastiden, s.o.) bzw. 2×10^8 Plastiden für nicht-radioaktive Ansätze wie folgt weiterbearbeitet: Die Plastiden wurden durch Zentrifugation pelletiert (5.000 rpm, 1 min, 4°C), der Überstand verworfen und 10^8 Plastiden in je 50 μl 400 mM Sorbit, 50 mM HEPES/KOH, pH 8.0 resuspendiert. Nach Zugabe von 450 μl TMK-Puffer (10 mM Tris/HCl, pH 6.8, 10 mM MgCl_2 , 20 mM KCl) und vorsichtiger Durchmischung wurden die Plastiden für 5 min auf Eis lysiert, anschließend durch Zentrifugation pelletiert (5.000 rpm, 1 min, 4°C) und der Überstand mit den stromalen Proteinen verworfen. Die Membranen wurden zur Waschung in 200 μl TMK-Puffer resuspendiert und erneut zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde einmal wiederholt. Anschließend wurde das Membranpellet in 50 μl TMK-Puffer resuspendiert. Es wurden dann 150 μl 2% (w/v) n-Dodecyl- β -D-maltosid in TMK-Puffer zugesetzt (Endkonzentration 1.5% (w/v)) und die Membranen vorsichtig solubilisiert. Dieser Ansatz wurde dann für 40 min auf Eis inkubiert. Zum Abtrennen nicht-solubilisierter Bestandteile wurde eine Zentrifugation bei 12.000 rpm, 15 min, 4° C durchgeführt. Der Überstand mit den solubilisierten Membranen wurde anschließend auf einen linearen Saccharosegradienten geladen.

2.5.11.3 Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation

Zur Herstellung eines linearen Saccharosegradienten wurden zehn Konzentrationsstufen (0.1 M bis 1 M Saccharose in TMK-Puffer mit 0.06% (w/v) n-Dodecyl- β -D-maltosid) angesetzt. Mit Hilfe einer Peristaltikpumpe (Gilson minipuls 2) und einer dünnen Glaskapillare wurde ein

Zehnstufen-Gradient mit je 1 ml pro Stufe durch Unterschichtung mit der jeweils höheren Saccharosekonzentration hergestellt und über Nacht bei 4° C stehen gelassen. Die solubilisierten Membranen (200-400 µl je Gradient) wurden überschichtet und es folgte die Ultrazentrifugation für 16.5 Stunden bei 38.600 rpm (entspricht 180.000 g für den mittleren Radius) und 4°C im SW40Ti-Rotor. Nach der Zentrifugation wurde der Gradient unter grünem Sicherheitslicht mit Hilfe der Peristaltikpumpe und der Glaskapillare von unten nach oben in 1 ml – Fraktionen geerntet. Diese Fraktionen wurden für die Ko-Immunopräzipitation verwendet (s.u.) oder die Proteine wurden für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese durch Zugabe ad 10% TCA für 30 min auf Eis gefällt, 30 min bei 12.000 rpm, 4°C zentrifugiert und die überstandsfreien Pellets anschließend in je 200 µl Solubilisierungspuffer (66 mM Na₂CO₃, 2% (w/v) SDS, 66 mM DTT, 10 % (w/v) Saccharose, 0.03% (w/v) Bromphenolblau) rückgelöst.

2.5.11.4 Ko-Immunopräzipitation bei ausgesuchten Fraktionen des Saccharose-Dichtegradienten

Ausgewählte Fraktionen des Saccharose-Dichtegradienten wurden unter grünem Sicherheitslicht wie folgt weiterbearbeitet: Die Fraktionen wurden zunächst halbiert. Zu je 500 µl Fraktionsinhalt wurden 10 µl affinitätsaufgereinigter HCF136-Antikörper bzw. 6.6 µl affinitätsaufgereinigter HCF164-Antikörper (vgl. Lennartz, 2000) gegeben (entspricht jeweils 5 µg Immunglobulin) und auf Eis für ca. 3 Stunden unter gelegentlicher sanfter Durchmischung inkubiert. In TMK-Puffer über Nacht vorgequollene Protein A-Sepharose (Sigma-Aldrich, München) wurde dreimal mit TMK-Puffer gewaschen und letztendlich auf eine Konzentration von 125 mg Sepharose pro ml in TMK-Puffer gebracht. Zu jedem 500 µl - Ansatz wurden 30 µl Protein A-Sepharose gegeben und die Inkubation wie oben beschrieben für weitere zwei Stunden fortgesetzt. Durch Zentrifugation wurden die Antigen-Antikörper-Protein A-Konjugate pelletiert (5000 rpm, 4°C, 1 min) und der Überstand komplett abgenommen. Es folgten zwei Waschungen mit TMK-Puffer ohne oder mit 0.06% n-Dodecyl-β-D-maltosid. Zum Schluß wurde die Sepharose quantitativ von Flüssigkeit befreit und die noch anhaftenden Proteine wurden durch Zugabe von 90 µl Solubilisierungspuffer abgelöst (5 min bei Raumtemperatur, anschließend Erhitzen für 2 min auf 70°C). Nach Zentrifugation bei 10.000 rpm, RT, 5 min wurde der Überstand jeweils in ein neues Gefäß überführt.

2.5.12 Immunoaffinitätschromatographie mit dem HCF136-Antiserum

2.5.12.1 Herstellung einer HCF136-Antikörper-Sepharose für Immunoaffinitäts-Chromatographie

Die Herstellung einer mit HCF136-Antikörper beladenen Sepharose erfolgte mit Hilfe des "ImmunoPure Protein A IgG Orientation Kit" (Pierce, Rockford, USA) nach Herstellerangaben. Dabei wird die affinitätsaufgereinigte IgG-Fraktion des HCF136-Antiserums zunächst an eine mit Protein A beladene Sepharose gebunden. Entscheidend ist, daß die Antikörper mit ihrem F_c-Teil gerichtet an Protein A-Moleküle binden, so daß die variablen F_v-Regionen frei in den Raum der umgebenden Lösung ragen und Antigene sterisch ungehindert binden können. Die Bindung von Antikörper an Protein A beruht auf ionische und hydrophobe Interaktionen und kann daher bei hohen Salzkonzentrationen, niedrigem und hohem pH-Wert der Lösung bzw. Zusatz von Detergenzien wieder gelöst werden. Sie wurde daher in einem anschließenden kovalenten Quervernetzungsschritt mit Dimethylpimelimidat (DMP) nach Herstellerangaben fixiert.

Vor der Kopplung der IgG-Fraktion mußte diese zunächst dialysiert werden, da der Tris/HCl-Puffer der Fraktion primäre Amingruppen trägt, die beim Quervernetzungsschritt mit DMP mit der eigentlich beabsichtigten Reaktion konkurrieren. Zur Dialyse wurden Membranschläuche (ZelluTrans V-Serie, Roth, Karlsruhe) mit einer Ausschlußgröße von 15.000 verwendet. 2 ml affinitätsaufgereinigte IgG-Fraktion vom HCF136-Antiserum (0.5 mg/ml IgG) in 200 mM Tris/Glycin, pH 7.5 wurden für 24 Stunden bei 4° C gegen PBS-Puffer (10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, pH 7.3, 2.7 mM KCl, 140 mM NaCl) dialysiert, wobei insgesamt 3 mal 1 Liter PBS-Puffer verwendet wurden. Das Volumen der IgG-Fraktion betrug zuletzt etwa 4 ml. Die Kopplung der Sepharose fand in einer Mischung aus 2 ml Bettvolumen Protein-A-Sepharose, 4 ml dialysierte HCF136-IgG-Fraktion und 4 ml 50 mM Natriumborat-Puffer, pH 8.2 statt. Alle weitere Schritte erfolgten nach Herstellerangaben. Mit den 2 ml-Bettvolumen Sepharose wurde später eine Säuleneinheit gefüllt. Zur Negativkontrolle wurde in gleicher Weise wie oben beschrieben eine mit GST-Antikörper (Goat Anti-GST Antibody, IgG-Fraktion, 5 mg/ml, Amersham Pharmacia Biotech, Schweden) beladene Protein A-Sepharose hergestellt.

2.5.12.2 Aufreinigung von HCF136 aus solubilisierten Spinat-Thylakoiden mit Hilfe einer HCF136-Antikörper-Sepharose

Thylakoide aus Spinat wurden wie oben beschrieben isoliert und zuletzt in 10 mM HEPES/KOH, pH 7.5, 50 mM NaCl in einer Konzentration von 1mg/ml Chlorophyll resuspendiert. Nach Zugabe ad 0.2 mM PMSF wurde die Suspension durchmischt und 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 1 Volumen 2% (w/v) n-Dodecyl-β-D-maltosid in 10 mM HEPES/KOH, pH 7.5, 50 mM NaCl. Dieses Gemisch wurde 1 Stunde auf Eis unter gelegentlicher vorsichtiger Durchmischung inkubiert und anschließend 10 min bei 10.000 rpm und 4° C zentrifugiert. Die in 1% (w/v) DM solubilisierten Thylakoide wurden 1:20 mit 10 mM HEPES/KOH, pH 7.5, 50 mM NaCl verdünnt (Endkonzentrationen: 0.05% (w/v) DM, 0.025 mg/ml Chlorophyll; Gesamtvolumen etwa 100 ml) und auf Eis aufbewahrt. Die Immunoaffinitäts-Chromatographie wurde bei 4° C durchgeführt. HCF136- bzw. GST-Antikörper-Säulen mit je 2 ml Bettvolumen Sepharose wurden je zweimal mit 5 ml 10 mM HEPES/KOH, pH 7.5, 50 mM NaCl, 0.03 % (w/v) DM vorgespült. Anschließend wurde jeweils die Hälfte der verdünnten solubilisierten Thylakoidlösung druckfrei durch beide Säulen laufen gelassen. Die Waschung der Säulen erfolgte mit zwei mal 5 ml 10 mM HEPES/KOH, pH 7.5, 50 mM NaCl, 0.03 % (w/v) DM. Die Elution der gebundenen Antigene wurde mit 5 ml Elutionspuffer (100 mM Glycin/HCl, pH 2.8, 200 mM NaCl, 0.03% (w/v) DM) und anschließend 5 ml 10 mM HEPES/KOH, pH 7.5, 50 mM NaCl, 0.03 % (w/v) DM durchgeführt, wobei 4 x 2.5 ml-Fractionen gesammelt wurden. Durch 500 µl vorgelegter 1 M Tris/HCl, pH 7.5 wurden die Eluatfraktionen sofort auf neutralen pH-Wert gebracht. Die Eluatfraktionen wurden zum Schluß mit 10% (w/v) TCA gefällt und die überstandsfreien Proteinpellets in je 100 µl Solubilisierungspuffer (s.o.) rückgelöst.

2.5.13 Importversuche von *in vitro*-synthetisiertem HCF136-Vorläuferprotein in Erbse-Chloroplasten

Zur Herstellung eines cDNA-Klons von HCF136, der unter der Kontrolle des T7-Promotors steht, wurde die ursprüngliche cDNA aus pcAt-HCF136 (Plücken, 1997) am 3'-Ende mit einem BamHI-Linker ausgestattet und die mit BamHI-geschnittene cDNA anschließend in pBluescript KS kloniert. Klone mit geeigneter Orientierung wurden durch Restriktionsanalysen unter Ausnutzung asymmetrisch angeordneter Schnittstellen (z.B. XbaI) identifiziert. Ein

entsprechender Klon (pcAt-HCF136-T7) wurde für die *in vitro*-Transkription eingesetzt. Zur Herstellung von Vorläuferprotein wurde eine *in vitro*-Translation in einem Weizenkeim-Extrakt in Gegenwart von ^{35}S -Methionin zur radioaktiven Markierung angeschlossen. Zur Kontrolle und für Konkurrenzversuche wurde Vorläuferprotein der PSII-23kD-Untereinheit auf gleiche Weise synthetisiert. Die Importversuche wurden wie in Brock *et al.* (1993) beschrieben durchgeführt. Importhemmung wurde durch den Gebrauch von 4 μM Nigericin (+10 mM KCl) bzw. 10 mM Natriumazid erreicht (Cline *et al.*, 1993).

Der Austausch des Zwillingsarginin-Motiv (RR) in der HCF136 cDNA wurde durch gezielte Mutagenese in ein Zwillingslysin (KK) umgewandelt und ist in Hynds *et al.* (2000) beschrieben. Die Versuche zum Import wurden im Labor von Prof. C. Robinson (University of Warwick, England) von P. Hynds durchgeführt.

2.5.14 Isolierung von Thylakoiden aus Mesophyll- und Bündelscheidenzellen von Mais und Sorghum

Die Isolation von Thylakoiden aus Mesophyll- und Bündelscheidenzellen von Mais und Sorghum ist in Meierhoff und Westhoff (1993) beschrieben und entsprechende Proben wurden freundlicherweise von Dr. K. Meierhoff (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) zur Verfügung gestellt. Die Kreuzkontamination von Mesophyll- und Bündelscheiden-Membranen liegt im Bereich von 5-10%.

2.5.15 Einsatz von biochemischen Quervernetzern zur Identifizierung von Interaktionspartnern des HCF136-Proteins

Biochemische Quervernetzer können dazu genutzt werden, kurzzeitige oder schwache Protein-Protein-Interaktionen durch kovalente Kopplung zu fixieren. Insofern stellen sie eine weitere mögliche Technik dar, um die Interaktionspartner von HCF136 auffindig zu machen. Von der Firma Pierce (Rockford, USA) wird eine große Vielfalt an Quervernetzern angeboten. Sie werden einerseits nach ihrer Struktur in verschiedene Gruppen eingeteilt, die wiederum die Reaktionsfähigkeit mit bestimmten funktionellen Zielgruppen auf einer Proteinoberfläche bestimmt. Zum anderen unterscheiden sich Quervernetzer in ihrer Löslichkeit in wässrigen oder organischen Lösungsmitteln, der Möglichkeit einer nachträglichen Spaltung der kovalenten Verknüpfung, hinsichtlich der Länge einer kovalenten Brücke zwischen den funktionellen Gruppen zweier Interaktionspartner und der Möglichkeit der Photoaktivierung. Quervernetzer unterscheiden sich zudem beträchtlich in ihrer Reaktivität. In dieser Arbeit wurden drei verschiedene Quervernetzer ausgewählt und in Gesamtthylakoid-Suspensionen eingesetzt: Dithiobis(sulfosuccinimidylpropionat) (DTSSP) ist ein wasserlöslicher homobifunktionaler N-Hydroxysuccinimidester, der primäre Amingruppen miteinander verknüpfen kann. Aufgrund einer Disulfidbrücke kann der Quervernetzer im Nachhinein gespalten werden. Bei der Verwendung muß allerdings oxidative Umgebung vorhanden sein. 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) gehört zur Gruppe der Carbodiimide und bewirkt eine Verknüpfung von einer primären Aminogruppe mit einer Carboxylgruppe unter Bildung einer Amidbindung (0-Längen-Quervernetzung). Die Reaktion läßt sich durch das Hilfsreagenz N-Hydroxysulfosuccinimid (Sulfo-NHS) fördern. p-Azidophenylglyoxal (APG) ist ein heterobifunktionaler Quervernetzer, der einerseits spezifisch mit Arginin-Seitenketten und andererseits unspezifisch reagiert. Die unspezifische Reaktion von APG wird durch UV-Strahlung induziert.

Die Verwendung der Quervernetzer erfolgte unter Berücksichtigung der Vorgaben von G.T. Hermanson (1996) bzw. der Vorgaben der Firma Pierce.

Das mature HCF136-Protein verfügt über 41 Carboxyl-Seitenreste, 22 Arginin-Seitenreste und 13 Lysin-Seitenreste (primäre Amingruppe) und sollte damit für alle drei Quervernetzer geeignet sein. Die möglichen Zielproteine des PS II-Reaktionszentrums sind aufgrund ihres Membranproteincharakters weniger optimal mit reaktionsfähigen Seitenresten ausgestattet. So enthalten D1, D2, PsbE und PsbF auch in den luminal exponierten Bereichen Carboxyl- und Arginin-Seitenreste, jedoch nur das D2-Protein besitzt im luminalen C-Terminus einen Lysin-Rest. Das 34 kD-Protein (PsbO) demgegenüber verfügt über eine Vielzahl von allen drei in Frage kommenden Seitenresten.

2.5.15.1 Verwendung des Quervernetzers DTSSP

Intakte Chloroplasten aus HCF136-Überexpressionslinien von *Arabidopsis thaliana* wurden nach Standardprotokoll isoliert. Die Lyse fand in 50 mM MES/KOH, pH 6.0 statt. Die Thylakoide wurden durch Zentrifugation von den stromalen Proteinen getrennt und einmal im Lysepuffer gewaschen. Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe der Suspension mit 1, 0.5, 0.33, 0.25 und 0.1 mg/ml Chlorophyll in je 500 µl 50 mM MES/KOH, pH 6.0 erstellt. Zuvor abgewogene Portionen an DTSSP wurden zu den verschiedenen Suspensionen gegeben, so daß eine Konzentration von 10 mM erreicht wurde (außer 0-Kontrolle). Die Reaktion wurde für insgesamt 180 min bei 4° C unter kontinuierlicher Rotation der Suspensionen durchgeführt. Nach 30, 60, 90, 120 und 180 min wurden je 100 µl Thylakoide abgenommen und zum Abbau des überschüssigen DTSSP mit 2 µl 1 M Tris/HCl, pH 7.5 vermischt. Nach 30 minütiger Inkubation auf Eis wurden die Proben bei -70° C gelagert.

2.5.15.2 Verwendung des Quervernetzers EDC

Intakte Chloroplasten aus HCF136-Überexpressionslinien von *Arabidopsis thaliana* wurden nach Standardprotokoll isoliert. Die Lyse und Waschung der Thylakoide fand in 100 mM MES/KOH, pH 7.5 statt. Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe der Suspension mit 1, 0.5, 0.33, 0.25 und 0.1 mg/ml Chlorophyll in je 900 µl 100 mM MES/KOH, pH 7.5 erstellt. EDC und Sulfo-NHS wurden zur Herstellung einer 10fach konzentrierten Stammlösung in 100 mM MES/KOH, pH 7.5 unmittelbar vor Gebrauch gelöst (40 mM EDC, 100 mM Sulfo-NHS). Je 50 µl wurden zu den vorgelegten Aliquots gegeben (0-Kontrolle: 100 µl reiner Puffer) und die Reaktion wurde für 60 Minuten bei Raumtemperatur durchgeführt, wobei die Suspensionen kontinuierlich langsam rotiert wurden. Nach 1, 2, 5, 10, 15, 20, 30 und 60 min wurden 100 µl Suspension aus den einzelnen Verdünnungen entnommen und zum Abbau an überschüssigem EDC mit Hydroxylamin ad 10 mM vermischt. Die Suspensionen wurden zunächst 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, dann für 30 min auf Eis, bevor sie bei -70°C gelagert wurden.

2.5.15.3 Verwendung des Quervernetzers APG

Eine Verdünnungsreihe aus Thylakoiden von *Arabidopsis* Überexpressionslinien wurde wie unter 2.5.16.1 beschrieben hergestellt. APG wurde in vorher abgewogenen Portionen frisch zu den vorgelegten Suspensionen gegeben, so daß eine Endkonzentration von 5 mM erreicht wird. Die Reaktion der Glyoxalgruppe mit den Arginin-Resten findet spontan bei Raumtemperatur statt, daher wurden die Suspensionen zunächst für 60 min bei Raumtemperatur langsam rotiert.

Anschließend wurden die Suspensionen auf einer Titerplatte verteilt, die in Eiswasser gekühlt war. Die Suspensionen wurden nun mit einer umgedrehten UV-Durchlichtplatte (Maximum 254 nm) 15 min lang bestrahlt, um die Azidophenylgruppe zu aktivieren. Zuletzt wurden die Proben bei -70°C gelagert.

2.5.16 Radioaktive *in vivo*-Markierung von *Arabidopsis*-Keimlingen

Für die radioaktive *in vivo*-Markierung wurden 10 Tage alte steril auf MS-Medium angezogene *Arabidopsis thaliana*-Keimlinge verwendet. Die Keimlinge (ca. 20-30 Stück) wurden mit einer Rasierklinge von Wurzel und 1/3 des Hypokotyls befreit und 15 min in Wasser mit 200 mg/l Cycloheximid (Sigma-Aldrich, München) bei Raumtemperatur vorinkubiert, um die cytosolische Translation zu vollständig zu hemmen. Anschließend wurden die Keimlinge mit dem Hypokotyl in die Löcher einer Mikrotiterplatte gelegt, wobei jeweils 20 μl eines 1:1 Gemisches aus ^{35}S -Methionin ("*in vivo* labelling grade", spezifische Aktivität $> 1.000\text{ Ci/mmol}$, Amersham Pharmacia Biotech, Schweden) und Wasser mit 200 mg/l Cycloheximid vorgelegt waren. Die Markierung wurde bei Raumtemperatur und 50 μE durchgeführt. Die Mikrotiterplatte wurde nach 15 min abgedeckt, um ein zu starkes Austrocknen der Keimlinge zu verhindern. Nach der Markierung wurden die Keimlinge mehrfach mit Wasser gespült und in Eppendorfgefäßen in 500 μl eiskaltem TMK-Puffer (10 mM Tris/HCl, pH 6.8, 10 mM MgCl_2 , 20 mM KCl) mit einem Potter vorsichtig zerkleinert. Durch Zentrifugation (1 min 6.000 rpm, 4°C) wurden die Membranen und unlöslichen Zellwandbestandteile pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet noch 2 mal in TMK-Puffer gewaschen.

2.5.17 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese werden Proteine mit dem anionischen Detergenz SDS denaturiert und beladen. Da das Masse-Ladungsverhältnis annähernd konstant ist und die endogene Ladung eines Proteins weitgehend vernachlässigt werden kann, wird eine Auftrennung eines Proteingemisches nach dem Molekulargewicht ermöglicht. Das in dieser Arbeit verwendete diskontinuierliche Gelsystem (Laemmli, 1970) war zusammengesetzt aus einem Sammelgel (5% Polyacrylamid; Acrylamid/Bisacrylamid=30/0.8, 125 mM Tris/HCl, pH 6.8) und einem Trenngel (12.5% Polyacrylamid; Acrylamid/Bisacrylamid=30:0.8, 375 mM Tris/HCl, pH 8.8). Sollten kleinere Proteine aufgetrennt werden, wurde meist ein Trenngel mit 14 % Polyacrylamid eingesetzt. Zur Auftrennung von hochmolekularen Proteinen (z.B. nach Quervernetzungsversuchen) wurde das Trenngel mit Hilfe eines Gradientenmischers in Form eines kontinuierlichen 5%-12,5%igen Polyacrylamid-Gradienten angefertigt. Bei der Auftrennung von Membranproteinen wurde dem Trenngel Harnstoff ad 4 M beigefügt, in einigen Fällen (insbesondere wenn größere Membranproteine wie PSI-A/B im Mittelpunkt des Interesses standen) wurde Harnstoff ad 6 M zugesetzt. In diesen Fällen wurde das Trenngel auch mit 0,1% (w/v) SDS ergänzt. Als Laufpuffer diente eine Lösung bestehend aus 25 mM Tris/HCl, pH 8.8, 192 mM Glycin und 0,1% (w/v) SDS. Das Trenngel hatte eine Länge von etwa 19 cm und eine Dicke von 1 mm.

Zur Vorbereitung der Proteinproben für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden die Proteine entweder in 1 x Laemmli-Puffer (62.5 mM Tris/HCl, pH 6.8, 2% (w/v) SDS, 10% (v/v) 2-Mercaptoethanol, 10% (v/v) Glycerin, 0.03% (w/v) Bromphenolblau) oder in 1 x Solubilisierungspuffer (66 mM Na_2CO_3 , 2% (w/v) SDS, 66 mM DTT, 10 % (w/v) Saccharose, 0.03% (w/v) Bromphenolblau) für ca. 15 min bei Raumtemperatur denaturiert, 30 Sek. bei 70°C

erhitzt und anschließend 10 min bei 10.000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert, um unlösliche Bestandteile zu pelletieren.

Die Elektrophorese wurde bei 110-140 V konstanter Spannung für 14-18 Stunden bei Raumtemperatur durchgeführt.

2.5.18 Blue-Native-Gelelektrophorese

Die Prozedur geht auf die von Schägger und von Jagow (1991) entwickelte Methode zur nativen Gelelektrophorese von Proteinen zurück. Sie basiert darauf, daß der Farbstoff Coomassie Brilliant Blau sich ähnlich wie das Detergenz SDS an Proteine bzw. an Mizellen aus mit ϵ -Aminocaprinsäure/n-Dodecyl- β -D-maltosid solubilisierten Proteinkomplexen anlagert und so für eine negative Ladung entsprechend des Molekulargewichts sorgt. Das in dieser Arbeit verwendete Gelsystem war zusammengesetzt aus einem Sammelgel (4% Polyacrylamid; Acrylamid/ Bisacrylamid=30:0.8), 500 mM ϵ -Aminocaprinsäure, 50 mM Bis-Tris/HCl, pH 7.0) und einem Trenngel (Gradient 6%-12% Polyacrylamid; Acrylamid/Bisacrylamid =30:0.8, 500 mM ϵ -Aminocaprinsäure, 50 mM Bis-Tris/HCl, pH 7.0). Als Anodenpuffer diente eine Lösung bestehend aus 50 mM Bis-Tris/HCl, pH 7.0. Als Kathodenpuffer wurde eine Lösung bestehend aus 50 mM Tricine, 15 mM Bis-Tris/HCl, pH 7.0 und 0.02% (w/v) Serva blue G verwendet.

Vor der Gelelektrophorese wurden die Proteinproben wie folgt vorbereitet: Sämtliche Lösungen und Materialien wurden auf 4°C vorgekühlt. Gesamtmembranen aus ca. 20 *Arabidopsis*-Keimlingen (14 Tage alt) wurden in TMK-Puffer (10 mM Tris/HCl, pH 6.8, 10 mM MgCl₂, 20 mM KCl) gewaschen und pelletiert, in 60 μ l ACA-Puffer (750 mM ϵ -Aminocaprinsäure, 50 mM Bis-Tris/HCl pH 7.0, 0.5 mM EDTA) resuspendiert und für 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Proteine durch Zugabe von 5 μ l 10% (w/v) n-Dodecyl- β -D-maltosid auf für 10 min Eis und abgedunkelt solubilisiert. Zur Abtrennung nicht-solubilisierter Bestandteile wurde für 10 min, 10.000 rpm, 4° C zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend mit 5 μ l der Coomassie-Beladungslösung, bestehend aus 5% (w/v) Serva blue G und 750 mM ϵ -Aminocaprinsäure gemischt. Die Proben wurden auf das vorgekühlte Gelsystem geladen (ca. 6°-10°C) und solange sich die Proteine noch im Sammelgel befanden, wurde eine Spannung von 150 V angelegt. Wenn die Proben in das Trenngel eingewandert waren, wurde die Spannung schrittweise auf 500-1000 V erhöht. nachdem die Coomassie Blau-Lauffront etwa die Hälfte des Trenngels erreicht hatte, ist der Kathodenpuffer gegen einen ungefärbten gleicher Zusammensetzung ohne Farbstoff ersetzt worden. Der Gellauf erfolgt unter Kühlung bei 6-10°C. Die angegebenen Spannungswerte beziehen sich auf eine Gesamtgelgröße von 20 x 20 x 0.75 cm (BioRad-System).

Zur anschließenden Auftrennung der Proteinkomplexe nach der Blue-Native-Gelelektrophorese wurde in einer zweiten Dimension eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese angeschlossen. Hierzu wurden die Spuren der nativen Auftrennung mit einem scharfen Skalpell ausgeschnitten und in Solubilisierungspuffer (66 mM Na₂CO₃, 2% (w/v) SDS, 66 mM DTT) für 20 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Gelstreifen wurden anschließend quer auf ein 1mm dickes SDS-Polyacrylamid-Harnstoffgel mit Sammelgelabschnitt gelegt und in Sammelgel einpolymerisiert. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 15° C und 40 mA für 12-14 Stunden. Die Experimente zur Blue-Native-Gelelektrophorese und zur Auftrennung der Proteine in der zweiten Dimension wurden im Labor von PD Dr. Lutz Eichacker während eines dreiwöchigen Aufenthaltes an der Ludwig-Maximilian-Universität in München bzw. später von Dr. Bernd Müller durchgeführt.

2.5.19 Färbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen

Zur Färbung von Proteinen in einem Polyacrylamidgel wurde das Gel in einer Coomassie-Färbelösung (50% (v/v) Methanol, 7% (v/v) Essigsäure, 0.25% (w/v) Serva Blau R) für ca. 1 Stunde unter Schwenken inkubiert. Danach wurde der Hintergrund des Gels durch Inkubation für mehrere Stunden in Entfärber (50% (v/v) Methanol, 7% (v/v) Essigsäure) entfärbt.

In einigen Fällen wurden Proteine in Polyacrylamidgelen über die 50-100-fach empfindlichere Silberfärbung nachgewiesen. Dabei wurde nach der Vorschrift von Blum *et al.* (1987) gearbeitet.

2.5.20 Nachweis von Proteinen auf Filtermembranen

2.5.20.1 Westerntransfer von Proteinen

Zum Westerntransfer von Proteinen wurde nach der Vorschrift von Towbin *et al.* (1979) vorgegangen: Nach der Gelelektrophorese wurde das Gel in Towbin-Puffer (96 mM Glycin, 10 mM Tris, 10% (v/v) Methanol) für 15 min bei Raumtemperatur geschwenkt. PVDF-Membranen (Hybond P, Porengröße 0.45 μm , Amersham Pharmacia Biotech) wurden 1 min in Methanol p.a. geschwenkt und dann ebenfalls für 15 min in Towbin-Puffer inkubiert. Wenn Nitrocellulose-Membranen (Protran BA79, Porengröße 0.1 μm , Schleicher & Schüll) eingesetzt wurden, entfiel die Inkubation in Methanol. Der Transfer erfolgte nach der "Semi-Dry"-Methode mit Apparaturen von Amersham Pharmacia Biotech (Multiphor II Nova Blot, LKB) bzw. von cti-GmbH, Taunusstein. Insgesamt sechs Lagen in Towbin-Puffer vorgetränktes Filterpapier (Gel Blotting Papier GB 002, Schleicher & Schüll, Dassel) wurden dabei verwendet. Der Transfer erfolgte bei Raumtemperatur, wobei für zwei Stunden eine konstante Stromstärke von 0.35 mA/cm² angelegt wurde. Sollten übereinandergeschichtete Mehrfach-Blots durchgeführt werden, wurde eine Cellophan-Folie (Amersham Pharmacia Biotech, Schweden) zwischen zwei Bloteinheiten gelegt.

2.5.20.2 Immunodetektion von Proteinen

Der spezifische Nachweis von Proteinen auf den Westerntransfer-Membranen erfolgte immunologisch mit Hilfe des ECL-Systems (Enhanced Chemo-Luminescence, Amersham Pharmacia Biotech). Dazu wurden die Membranen nach dem Transfer mit Roti-Block (Roth, Karlsruhe) für 1 Stunde bei Raumtemperatur unter Schwenken blockiert, anschließend 10 min in TBS-T-Puffer (20 mM Tris/HCl, pH 7.6, 137 mM NaCl, 0.1% (v/v) Triton X-100) gewaschen und schließlich mit Erstantikörper in Verdünnungen von 1:1.000 bis 1:10.000 in TBS-T für 2 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C schwenkend bzw. über-Kopf-schüttelnd inkubiert. Die Filter wurden anschließend 1 x 15 min und 2 x 5 min in TBS-T bei Raumtemperatur gewaschen. Die Inkubation mit Zweitantikörper (Horseradish Peroxidase Conjugated Goat Anti-Rabbit IgG, Sigma-Aldrich) zum Nachweis der Erstantikörper wurde in Verdünnungen von 1:20.000 in TBS-T für 1 Stunde bei Raumtemperatur durchgeführt. Die anschließende dreimalige Waschung wurde wie nach der Erstantikörper-Inkubation durchgeführt. Anschließend wurden die Filter feucht in Plastikfolie eingelegt, die ECL-Reaktion nach Angaben des Herstellers durchgeführt und die Filter gegen Röntgenfilm exponiert. Nach der ECL-Reaktion wurden die Filter 10 min in TBS-T gewaschen, feucht in Plastikfolie

eingeschweißt und bei 4°C aufbewahrt. Sollten weitere Proteine nachgewiesen werden, wurde die Prozedur wiederholt. Die Ablösung von Antikörpern von PVDF-Membranen erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

2.5.21 Autoradiographie radioaktiv markierter Proteine

Wenn Proteine radioaktiv markiert und anschließend über Gelelektrophorese aufgetrennt worden sind, so wurden die Gele anschließend zunächst in Entfärbelösung fixiert, auf Filterpapier gelegt und anschließend mit einem Gelrockner (Gel Dryer Model 583, Vakuumpumpe Pro Hydrotech, BioRad, München) getrocknet. Alternativ wurden die Proteine mit Hilfe des Western-Blots auf PVDF-Membranen transferiert und die Membranen getrocknet. Die getrockneten Gele oder Membranen wurden dann für ca. 5 Tage gegen eine "Imaging Plate" (Fujifilm BAS 1800) exponiert und diese mit Hilfe des "BAS Image Readers 1800" und der BAS Reader-Software 1.4 eingelesen. Die Auswertung und Quantifizierung der Bilddaten erfolgte mit Hilfe des Programms "Image Gauge 3.0" (Fuji-Film Co. KG Düsseldorf).

2.5.22 Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine in *E. coli* zur Herstellung von Antisera

2.5.22.1 Expression und Aufreinigung von rekombinantem HCF136-Protein

Für die Expression von HCF136 in *E. coli* wurde aus der Vollängen-cDNA in pcAt136-28 (vgl. Plücken, 1997) der Bereich des Gens von 226-1214 bp über PCR (KlenTaq-Polymerase, Clontech) amplifiziert und anschließend im Leserahmen in den Expressionsvektor pGEX-4T3 (Amersham Pharmacia Biotech) kloniert. Dabei wurden die Primer so ausgewählt, daß die Transitsequenz des Gens ausgespart bleibt und das Expressionskonstrukt mit dem mutmaßlichen Start des reifen Proteins („G-P-A-R-A-D-E-...“) ausgestattet ist (s. Abb. 3). Das eigene Stopcodon des Leserahmens wurde beibehalten. Insofern wurde nahezu das gleiche Protein exprimiert, wie es nativ im Chloroplasten vorliegen sollte. Als Einschränkung ist der Prolin => Serin-Austausch der 2. Aminosäure im rekombinanten HCF136 zu nennen, der aber an dieser Position keine größeren Auswirkungen in Bezug auf Faltung des Proteins erwarten läßt, da er nicht evolutionär konserviert ist (s. Abb. 3).

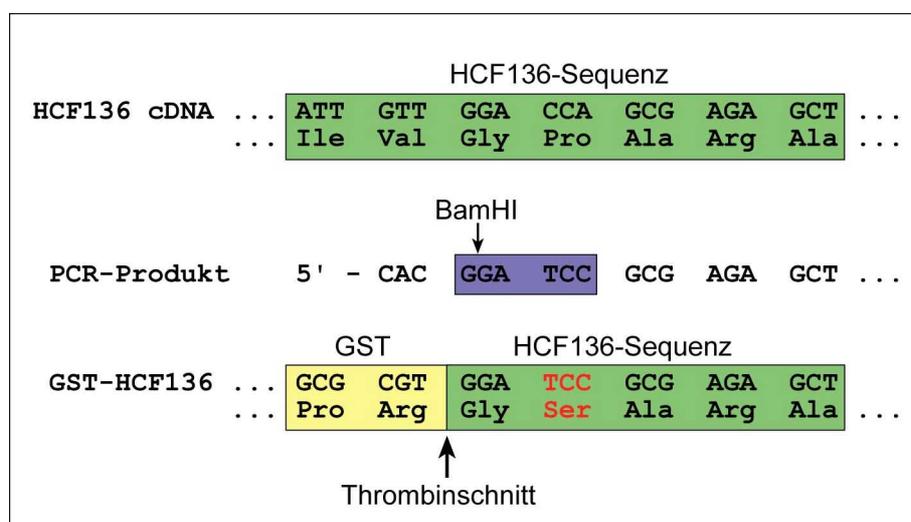


Abb. 3: Fusionskonstrukt für die HCF136-Expression als Glutathion-S-Transferase-Fusionsprotein. Rot markiert ist der Aminosäureaustausch im Vergleich zum nativen Protein.

Da der 5'-Primer mit einer BamHI-Schnittstelle ausgestattet wurde, liegt nach Ligation hinter der GST-Sequenz vom pGEX4T3-Vektor keine zusätzliche Fremdaminosäure jenseits der Thrombinschnittstelle, durch die nach Abspaltung mit der Endoprotease das rekombinante HCF136 freigesetzt wird. In einer Kooperation mit Dr. J. Meurer und Dr. G. Wiegand (Ludwig-Maximilians-Universität München bzw. Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried) wird dieser Klon derzeit eingesetzt, um das Protein in größerem Maßstab zu exprimieren und nativ aufzureinigen, um es letztendlich zu kristallisieren und die Tertiärstruktur aufzuklären.

E. coli BL21 DE3 -Zellen (NovaGene, USA) wurden mit pGEX4T3-136EX transformiert und über Nacht bei 37° C und 200 rpm in LB-Medium mit 100 mg/l Ampicillin geschüttelt, am nächsten Morgen 1:10 in gleichem Medium verdünnt und 3 Stunden bei gleicher Temperatur weiterinkubiert. Anschließend wurde für 3-4 Stunden mit 1 mM IPTG die Expression des Fusionsproteins induziert. Dabei wurden 1 ml-Aliquots zu mehreren Zeitpunkten der Induktion entnommen, um daraus Gesamtproteinextrakte zu gewinnen. Zur Proteinaufreinigung wurden die Zellen durch Zentrifugation pelletiert und in 50 mM Tris/HCl pH 7.9, 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 0.01 % (w/v) Triton X100 resuspendiert, ad 1 mg/ml mit Lysozym versetzt und für mindestens 2 Stunden bei -20° C eingefroren. Die Suspension wurde wiederaufgetaut und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Lysat eisgekühlt mit dem Branson Sonifier B12 (Danbury, USA) 4-5 mal bei Stufe 7-9 für jeweils 30 Sek. Beschallt, bis die Suspension nicht mehr viskos war. Nach Zentrifugation (10.000 rpm, 4° C, 20 min) wurde der Überstand mit Glutathion-Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech) im "Batch-Verfahren" bei 4° C über Nacht inkubiert, um das Fusionsprotein zu binden. Waschungen und Thrombin-Elution des HCF136-Proteins erfolgten nach Herstellerangaben unter Verwendung von PBS-Puffer (10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, pH 7.3, 2.7 mM KCl, 140 mM NaCl). Da die Thrombin-Eluate nicht nur das vollständige HCF136-Protein enthielten, sondern auch mit Fusionsproteinresten und kleineren Proteinen verunreinigt waren, wurde das rekombinante HCF136 über präparative SDS-Gelelektrophorese gereinigt (Hager *et al.*, 1980). Als Elutionspuffer diente 50 mM Tris/HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 0.1% SDS, 0.5% (v/v) 2-Mercaptoethanol. Die Proteine des Eluats wurden durch Zugabe ad 80 % Aceton bei -20°C über Nacht gefällt, zentrifugiert und angetrocknet. Die Rücklösung erfolgte in PBS-Puffer mit 0.2% (w/v) SDS.

2.5.22.2 Immunisierung von Kaninchen und Isolierung einer spezifischen IgG-Fraktion gegen HCF136

Das rekombinante HCF136-Protein lag in einer Konzentration von 0.5 mg Protein pro ml in PBS-Puffer mit 0.2% (w/v) SDS vor. Die Immunisierung von Kaninchen wurde von der Firma BioGenes (Berlin) übernommen und erfolgte nach Standardverfahren der Firma Dazu wurden insgesamt 3 mg Protein für die Immunisierung von zwei Tieren eingesetzt. Da die Präimmunsere der Kaninchen bereits deutliche unspezifische Reaktionen im Immunoblot gegen pflanzliche Proteine zeigten und da es sich bei HCF136 um einen Minoritätsfaktor in der Plastide handelt, wurden an eine Sepharosematrix 5 mg rekomb. HCF136-Protein gekoppelt und diese Sepharose wurde eingesetzt, um aus den Immunsere durch Affinitätschromatographie eine spezifische IgG-Fraktion gegen HCF136 herzustellen (BioGenes, Berlin). Die aufgereinigte IgG-Fraktion wurde für alle Immunoblot-Experimente in einer 1:1.000 bis 1:3.000-Verdünnung eingesetzt.

2.5.22.3 Expression und Aufreinigung weiterer Plastidenproteine

Da für die biochemische Charakterisierung von *hcf*-Mutanten zahlreiche Antikörper erforderlich sind, wurden im Rahmen dieser Arbeit und in Zusammenarbeit mit Chr. Driemel (vgl. Driemel, 2000) einige plastidäre Proteine bzw. Proteinabschnitte rekombinant in *E. coli* exprimiert, aufgereinigt und zur Immunisierung eingesetzt. Dazu zählen die Proteine PsbE (Cytochrom $b_{559\alpha}$), PsbH und Ycf39.

Die Klonierung erfolgte stets in den Expressionsvektor pGEX-4T3. Von PsbE wurde das komplette Leseraster (AS 1-83) verwendet. Bei PsbH wurde nur der hydrophile Abschnitt von AS 1-46 eingesetzt. Demgegenüber wurde bei Ycf39 fast das komplette Protein (AS 10-316) zur rekombinanten Expression verwendet. Die Expressionsbedingungen waren die gleichen, wie sie für die Expression von rekombinantem HCF136 verwendet wurden. Eine Expression bei geringeren Temperaturen (28° C) bzw. geringeren IPTG-Konzentrationen während der Induktion zeigte schwächere Proteinpegel und die Aufreinigung wurde dadurch nicht erleichtert. Da es sich bei PsbE und Ycf39 um integrale Membranproteine handelt, lagen die exprimierten Proteine stets in Einschlußkörperchen vor. Somit schloß sich die Affinitätschromatographie über Glutathion-Sepharose als Aufreinigungsmethode aus, da sie nur für lösliche Fusionsproteine zugänglich ist. In diesem Fall wurde zunächst das Pellet des bakteriellen Rohextraktes über präparative SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und das Fusionsprotein herausgeschnitten (Hager *et al.*, 1980). Das Gelstück wurde in einem Waring-Blendor zerkleinert, und in ca. 1 Volumen Erstelutionspuffer (50 mM Tris/HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 0.75% (w/v) Sarkosyl, 0.5% (v/v) 2-Mercaptoethanol) über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Durch Filtration über silikonisierte Glaswolle wurde der Überstand vom Polyacrylamid getrennt. Die Zugabe ad 1.5% (w/v) Triton X-100 führte zur Bildung von Mischzellen, deren denaturierende Wirkung weitgehend aufgehoben wurde. Pro 10 mg Fusionsprotein wurden 50 Units Thrombin zugesetzt und bei Raumtemperatur für mindestens 6 Stunden bei gelegentlicher Durchmischung inkubiert. Das geschnittene Protein konnte dann in einer zweiten präparativen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und der Fremdproteinanteil wie oben beschrieben ausgeschnitten und eluiert werden.

Der hydrophile PsbH-Abschnitt wurde als GST-Fusionsprotein über Affinitätschromatographie an Glutathion-Sepharose aufgereinigt und auch als Fusionsprotein für die Immunisierung eingesetzt (vgl. Driemel, 2000). Dies war insofern von Vorteil, als daß ein kurzer Proteinabschnitt von 46 AS alleine kaum immunogen ist. Das Antiserum enthielt dann zwar auch GST-Antikörper, die jedoch bei Immunoblot-Untersuchungen mit Membranproteinpräparationen nicht störten.

Insgesamt wurden für die Immunisierungen 1 mg rekomb. PsbE, 2 mg rekomb. Ycf39 und 7.5 mg GST-PsbH (entspricht 1 mg PsbH) eingesetzt.

3 Ergebnisse

3.1 Komplementation der Mutante *hcf136*

Um sicherzustellen, daß der Ausfall des Gens *HCF136* in der Tat alleine für den mutanten Phänotyp verantwortlich ist, mußte die Mutante *hcf136* mit dem in Plücker (1997) klonierten Gen (*pcAt-HCF136*) zwecks Komplementation transformiert werden. Hierfür wurde die Methode der Agrobakterien-vermittelten Transformation mit Wurzelstücken aus homozygoten Mutanten eingesetzt (Valvekens *et al.*, 1988). Abbildung 4 zeigt die Chlorophyll-Fluoreszenz-Induktionsmessungen an 3 Wochen alten Keimlingen vom Wildtyp, von der Mutante *hcf136* und von der komplementierten Mutante.

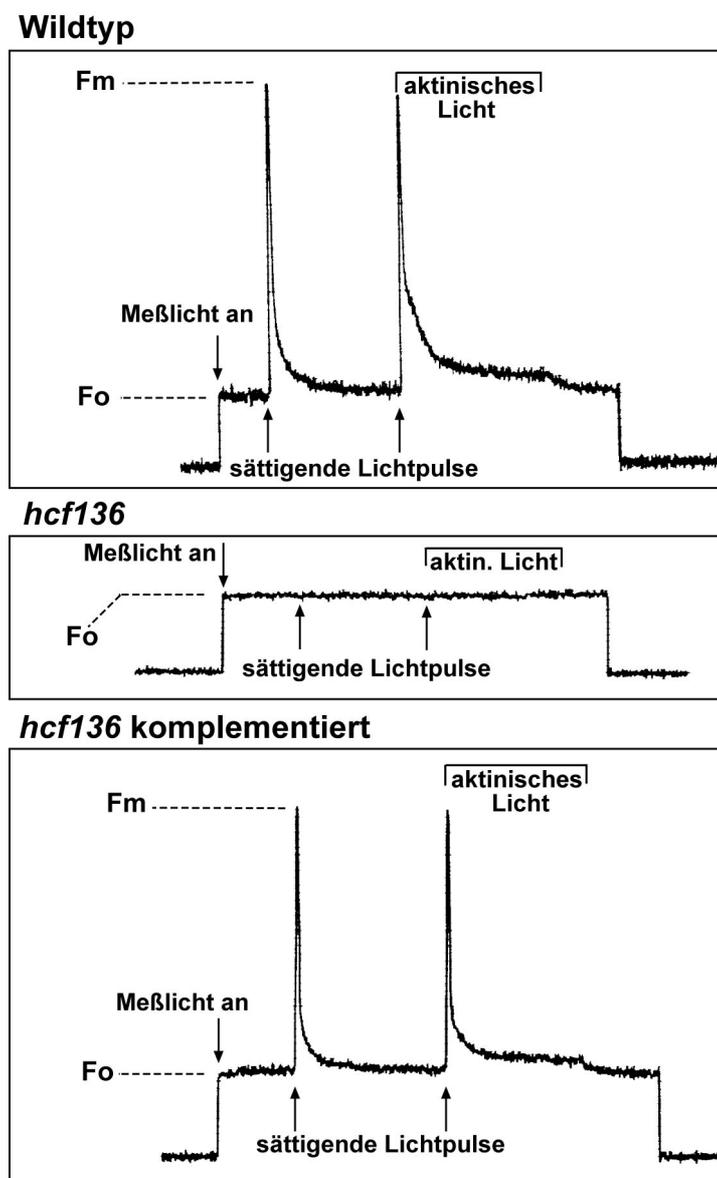


Abb. 4: Chlorophyll-Fluoreszenz-Induktionskinetiken von Wildtyp-Pflanzen, *hcf136*-Mutanten und komplementierten Mutanten aus *Arabidopsis thaliana*. F_0 ... Grundfluoreszenz beim Anschalten des Meßlichts, F_m ... maximale Fluoreszenz bei Gabe eines sättigenden Lichtpulses.

Hervorgerufen durch den drastischen Defekt in der Biogenese des Photosystems II erkennt man in der Mutante keinerlei variable Fluoreszenz (F_m-F_0) bei Verabreichung eines sättigenden Lichtpulses. In den komplementierten Linien hingegen sieht man ein für den Wildtyp typisches Chlorophyll-Fluoreszenz-Induktionsverhalten. Bei allen 13 komplementierten Linien wurde ein F_v/F_m -Verhältnis von 0,77-0,80 erreicht, das dem des Wildtypen entspricht. Die komplementierten Linien zeigten bei Verabreichung von aktinischem Licht eine Fluoreszenzlöschung wie beim Wildtyp. Insgesamt erkennt man, daß die Komplementation mit der *HCF136*-cDNA vollständig den Wildtyp-Phänotyp wiederherstellen konnte und somit der Ausfall dieses Gens in der Mutante alleine hinreichend für den mutanten Phänotyp ist.

3.2 Die Eigenschaften des HCF136-Proteins und seine Evolution

Um erste Informationen über die Eigenschaften des HCF136-Proteins ausfindig zu machen, wurden bioinformatische Untersuchungen anhand der Sequenzdaten durchgeführt. Datenbank-suchen ergaben, daß das *HCF136*-Gen bei *Arabidopsis thaliana* auf Chromosom 5 in der Nähe des RFLP-Markers mi90 lokalisiert ist (www.kazusa.or.jp/). Das Gen wird von 7 Introns unterbrochen (ohne Abbildung) und hat so eine Gesamtlänge von 2.45 kb (cDNA: 1.4 kb). In der Mutante *hcf136* liegt die T-DNA innerhalb des 5. Introns und führt so zu einer vollständigen Hemmung der Transkript-Akkumulation (Meurer, 1996c). Die Übersetzung des Leserahmens in die entsprechende Aminosäuresequenz liefert ein Protein von 403 Aminosäuren. Dies entspricht einer theoretischen Größe von 44.1 kD.

3.2.1 Das *HCF136*-Gen wurde im Laufe der Evolution von Plastidenvorläufern ins Kerngenom transferiert

In BLAST-Suchen konnten zur HCF136-Sequenz homologe Gene in den Cyanobakterien *Synechocystis* und *Anabaena*, in der ursprünglichen Alge *Cyanophora* (*Glaucocystophyceae*) und in *Guillardia* (*Cryptophyceae*) gefunden werden. Entsprechend der gültigen Nomenklatur werden diese Gene jeweils als *ycf48* bezeichnet. Der direkte Vergleich von HCF136 mit *Ycf48* aus *Synechocystis spec.* PCC6803 ergibt 48 % identische Aminosäurepositionen. Ein Vergleich der Proteinsequenzen aller fünf *ycf48*-Gene zeigt die Abb. 5. Da Cyanobakterien-Vorläufer nach der Endosymbiontentheorie als Ursprung der heutigen Plastiden höherer Pflanzen gelten (Mereschkowsky, 1905), handelt es sich bei HCF136 offensichtlich um ein ursprünglich cyanobakterielles Gen, das im Laufe der Evolution aus dem Plastom in das Kerngenom transferiert worden ist. Das im Cytosol synthetisierte Protein muß dann posttranslational in die Plastide reimportiert werden. Die aminoternale Erweiterung von HCF136 im Vergleich zu den cyanobakteriellen Vorläufern nimmt in diesem Zusammenhang die Funktion einer Transitsequenz wahr. In *Cyanophora paradoxa* ist das HCF136-homologe *ycf48*-Gen noch in der Cyanelle, einem chloroplasten-ähnlichen Organell, lokalisiert. Entsprechend zeigt das Protein hier auch noch keine aminoternale Erweiterung. Bei *Guillardia theta* dagegen hat der Transfer bereits stattgefunden. Interessanterweise gehört *Guillardia* zu einer Gruppen von Algen, bei denen sekundäre Endosymbiose stattgefunden hat (Douglas, 1994). Der Kern des ursprünglich endocytierten plastidentragenden Eukaryoten ist dabei zu einem Nukleomorph reduziert worden. Das *ycf48*-Gen von *Guillardia* befindet sich in diesem Nukleomorph (Maier *et al.*, 2000) und enthält ebenfalls eine Transitsequenz, die sich aber erheblich von der *Arabidopsis*-Transitsequenz unterscheidet.

ycf48 Syn	-----MPVKFPSLKF EQ LKQLVLV
ycf48 Anab	-----MKS WQ KIFAL
ycf48 Cyap	-----MILN WR KVIVSF
ycf48 Guil	-----MFINS FCL KNLLPVFS KN KT FLL NVKLS SNN KF EN HS NFF KIN RT KFINYL
HCF136 Ath	MASLQ LC DGYLLFK PS VSPR FL SQRIS HRL IPK ASS SP PP SP SS SSSSSSLS FS SR RE LLYQS
	: . : :
ycf48 Syn	AAIAV--FCVSCSHVPDLA<>FNPWQ EIA LETDS--TFADIA FT ED-PNHGWL VG TKETI
ycf48 Anab	LVVLL--LCIGCSKVPSTS<>YNPWA VVS LPT EA --KLLDIA FT EN-PQHG FL VGSSATL
ycf48 Cyap	LVIIL--TNFY NI SFTHA<>ESYK WE QIPLN TD E--ILLD IG FVPDQPQRG WLL GTRSTL
ycf48 Guil	LYPTL---TSLYP KF THA<>NTTSW TK V DLP VDS--VLF DI EFTD ECK HGWL VG SKGTF
HCF136 Ath	AAVSL SL SSIVG PARA <>DEQL SE W ERV FLPID PG VLLDIA FV DEPS RG FL LG TRQTL
	: : * : * : : ** * . . : * : * : *
ycf48 Syn	FETTDGGDTW EQ KLID-LGEEK---ASFS AV SFSGNEGWITGKPSILLHTT DGG QTWARI
ycf48 Anab	LETNDGGNNWQPLNLA-LDDDR---YRFDS V SFAGKEGWIVGEP SL LLHTT DE GRSWSRI
ycf48 Cyap	FETTDK GT WEL RS LN-LEDDK---YRLNS I SFSGKEGWITGKPAIILLHTT DGG SSWSRI
ycf48 Guil	LETDDGGNTWVPRTFANLDPDEELTYRFENISFEGQEGWIVGKPAIILYTKDGGK TW FRV
HCF136 Ath	LETKDGGSTWNPR SIP -SAEEDFN YR FNSISFKGKEGWIIGKPAIILLYTADAGENWDR I
	: ** * * . * : : . : ** * : * : * : * : * : * : * : *
ycf48 Syn	PLSEKLP GAP YSIIALGPQTAEMITDLGAIYKTTNGGKNW KAL VEGAV-----
ycf48 Anab	PLSEKLP GNP IAIQALGT DI AEMATDVGAIYKTTDGGKNW KAQ VEAAV-----
ycf48 Cyap	PLSNQLPGDPALITALGTGK AE LATDIGAIYRTENSGQTW KAQ IQEPL-----
ycf48 Guil	PVSPKLP GE PC LK ALGSESAELTTTSGAIYVTNNAGR NW KAQ VE TIDSTLNRTISSGV
HCF136 Ath	PLSSQLPGDMVFIKAT ED KS AE MVTD E GAIYVTSNRGY NW KA AI QETVSATLNRTVSSGI
	* : * : * * * * : * : * : * : * : * : *
ycf48 Syn	-----GVARTIQ R ST DGR YVAVSARGNFYSTWAPGQT EW TPHN RNS SRRLQTMGYGKD
ycf48 Anab	-----GVVRN LE RSVDGKYVAVS AK GSFYSTW EAG QNAWVPHN RNS SR RR VENMGFSQD
ycf48 Cyap	-----GVIRT VA RS EN GSYVAVS AK GNFYSTW KE GDDK WI SHPRQSS RR IQSMGFTNN
ycf48 Guil	SGASYFTGNVIN VI RNSEGKY LAI SSRGNFYLTWEPGQDFWIPRARETS RR IQSMGFIQN
HCF136 Ath	SGASYTGTFSAVN RS PDGRYVAVSSRGNF FL TWEPGQPYWQPHN RA VARRIQNMGWRAD
	* : * . : * * : * : * : * : * : * : * : * : *
ycf48 Syn	GQ---LWLLARGGQLQFSTDPDAEE---WSDVIA PQ DKG--SWGLLDLSFRTP EE VWVA
ycf48 Anab	G---LWLLARGGQVQFSDPANPDE---WLD AE TPELAT--SWGLLD MA YRTPNEVWIG
ycf48 Cyap	NR---LWMLTRGGQLWFSSNDSFDEPN--WEGPKT PE GKVGFLGLLN LAF KTPTEI W VS
ycf48 Guil	DNQKGI WM STRGG LS VSTKN FD FESISS FN FENIDIKTG--GYGILD AA FVNDKDI WI I
HCF136 Ath	GG---LWLLV RG GGLYLSKGTGITE-----EFEEV PV QSR--GFGILD VG YRSEEEAWAA
	. : * : . * * : . * * : . * : * : * : * : * : *
ycf48 Syn	GASGNLLMSQDGGQ TW AKDTGVEDIPANLYRVVFLSPEKGFVLGQDGI LL KYNPSTEVAMV
ycf48 Anab	GGSGNLLVST DG GK TW EKDRDVEEVAANFYKVVFLKPDQGFVIGDRGVLLKY-----
ycf48 Cyap	GGSGILLSSQDTGN TW KKETSTDNIPSNFYKISFIDKEVGFVLGNQGTLLRYVSL-----
ycf48 Guil	CGGGIVY NS TDKGNWTKVDGIDKLSGNLYKIKFVNNKGFILGNSG LL RYQ-----
HCF136 Ath	GGSGILLRTRNGGKSWNRDKAADNIAANLYAVK FV DDKKG FV LGNDGVLLRYV-----
	..* : : : * : * : : : * : * : * : * : * : * : *

Abb. 5: Vergleich der Ycf48-Aminosäuresequenzen von *Synechocystis spec.* PCC6803 (slr2034, Accession D90903), *Anabaena spec.* PCC7120 (www.kazusa.or.jp/cyano/anabaena), *Cyanophora paradoxa* (Accession U30821), *Guillardia theta* (freundlicherweise von Prof. U.G. Maier, Universität Marburg zur Verfügung gestellt) und der HCF136-Aminosäuresequenz von *Arabidopsis thaliana* (Accession Y15628). Der Vergleich wurde mit dem Programm Clustal W 1.7 erstellt und die Farbkodierung nachträglich eingeführt (hellgrün: Aminosäuren mit aliphatischen Seitenketten, dunkelgrün: AS mit aromatischen Seitenresten, rot: AS mit sauren Seitenketten, blau: AS mit basischen Seitenresten). Das Ende der Präsequenzen wurde durch eine Raute („<>“) markiert. Eine Sequenzmotiv-Wiederholung ist durch Kästen hervorgehoben. Identische Aminosäurepositionen sind durch Sterne markiert. Positionen mit ähnlichen Aminosäuren (z.B. Ladung, sterische Aspekte) sind durch Punkte gekennzeichnet.

Wenn man die gesamte aminoternale Erweiterung der HCF136-Sequenz entfernt, wird nach rechnerischer Voraussage ein reifes Protein mit einer Größe von ca. 38 kD geliefert.

Die Positionen mit identischen Aminosäuren beim Vergleich aller fünf Proteine verteilen sich mehr oder weniger gleichmäßig über die gesamte Sequenz des maturen Proteins. Die Sequenzidentität ist auch nicht davon abhängig, ob es sich um hydrophobe oder hydrophile / geladene Aminosäureseitengruppen handelt. Insgesamt ist die Verteilung von hydrophoben und hydrophilen / geladenen Aminosäuren über die gesamte Proteinsequenz relativ ausgeglichen. Auffällig ist eine Insertion von 19 Aminosäuren bei den Proteinsequenzen von *Arabidopsis* und *Guillardia* (Abb. 5).

3.2.2 Das HCF136-Protein enthält ein unbekanntes, sich wiederholendes Sequenzmotiv

Recherchen in der Proteinmotivdatenbank „PROSITE“ (Appel *et al.*, 1994) ergaben für HCF136 trotz höchster Empfindlichkeitsstufe keine entscheidenden Hinweise für die Funktion des Proteins. Es wurden vom ExpASy-Server nur mögliche Phosphorylierungs- und Myristylierungspositionen erkannt, die jedoch bei sehr vielen Proteinen vorhergesagt werden, so daß diese Vorhersage nur von geringfügigem Wert ist. Das HCF136-Protein enthält keine bereits bekannten Struktur motive. In der Proteinsequenz wurde allerdings eine dreimalige Wiederholung eines unbekanntes Sequenzmotives erkannt:

(L, I, V, F) – (L, F, Y) – X – (S, T) – X – (D, N) – X – G – X – (T, S, N) - W

Dabei steht X für eine beliebige Aminosäure, bei den Aminosäuren in Klammern wird jeweils eine der dort aufgeführten Aminosäuren an der entsprechenden Position ausgewählt. In Abb. 5 ist dieses Motiv durch die Kästen hervorgehoben. Man findet dieses Sequenzmotiv bei einer Reihe von Genen in Prokaryoten und der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (www.ncbi.nlm.nih.gov/Microb_blast/unfinishedgenome.html), allerdings ist die Funktion dieser Gene noch nicht bekannt oder so unterschiedlich, daß eine Funktionsableitung für das Motiv derzeit nicht möglich ist.

3.2.3 Relative Hydrophobizität des HCF136-Proteins

Die relative Hydrophobizität des HCF136-Proteins aus *Arabidopsis* bzw. der Ycf48-Proteine aus *Synechocystis*, *Cyanophora* und *Guillardia* ist in Abb. 6 zu sehen. Erwartungsgemäß sind die Hydropathie-Plots bei allen vier Sequenzen sehr ähnlich. HCF136 als Stellvertreter aller vier homologen Proteine zeichnet sich als überwiegend hydrophiles Protein aus. Es gibt zwar mehrere kurze hydrophobe Abschnitte, die jedoch von der Länge her nicht ausreichend sind, um eine Membran α -helikal zu durchspannen (kritische Länge: ca. 15 Aminosäuren; Eisenberg *et al.*, 1984). Auffällig ist allerdings, daß HCF136 von allen vier Ycf48-Vertretern den ausgeprägtesten hydrophoben Abschnitt am Aminoternus des reifen Proteins trägt. Dieser hat eine Länge von 18 Aminosäuren, wird allerdings von zwei geladenen Seitenketten unterbrochen (vgl. Abb. 5) Er sollte somit auch nicht in der Lage sein, eine Membran zu durchspannen. HCF136 dürfte aufgrund der rechnerischen Vorhersagen und aufgrund der heterogenen Aminosäureverteilung innerhalb des Proteins ein hydrophiles Protein mit globulärem Charakter sein. Diese Vermutung wurde durch Berechnungen zur Vorhersage der Sekundärstruktur gestützt, die einen ständigen Wechsel von Helix-, Faltblatt- und Coil-Bereichen ergaben.

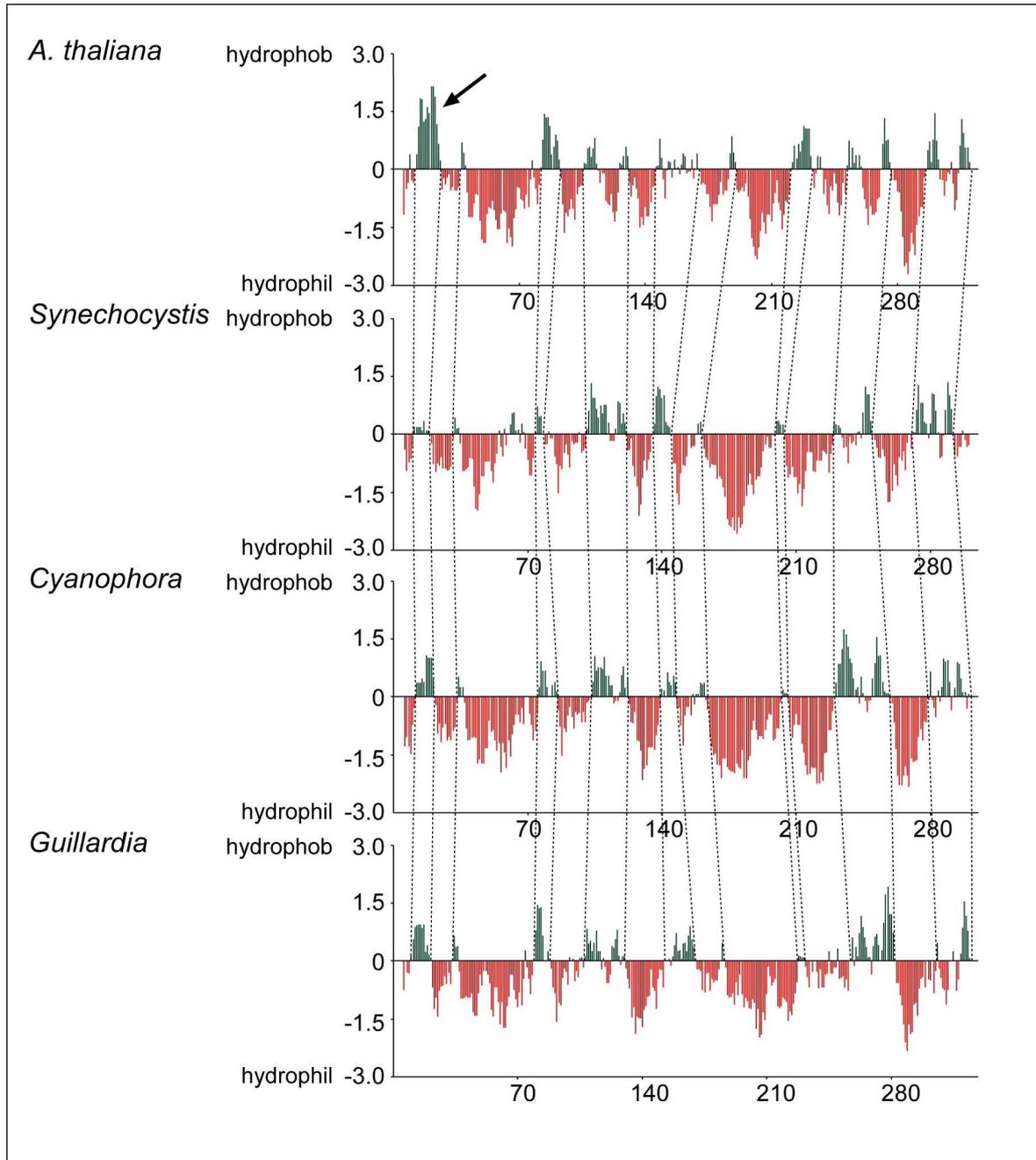


Abb. 6: Relative Hydrophobizität der Ycf48-Proteine aus *Arabidopsis thaliana*, *Synechocystis spec.*, *Cyanophora paradoxa* und *Guillardia theta*. Zur Berechnung wurde das Programm MacMolly Tetra Interpret eingesetzt (Aminosäure-Fenster: 12), wobei jeweils die Aminosäuresequenzen der reifen Proteine ohne Transitsequenzen verwendet wurden. Die einander entsprechenden Regionen wurden durch Linien verdeutlicht. Der bei *Arabidopsis* deutlicher ausgeprägte hydrophobe Abschnitt am Aminoterminus ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

3.3 Lokalisation des HCF136-Proteins im Chloroplasten

Die präzise Lokalisation des HCF136-Proteins im Chloroplasten sollte Hinweise auf seine mögliche Funktion liefern. Um dieses Ziel zu verfolgen, war zunächst die Herstellung eines Antiserums notwendig. Dazu wurde rekombinantes HCF136 in *E. coli* exprimiert, aufgereinigt und für die Immunisierung in Kaninchen verwendet.

3.3.1 Expression von rekombinantem HCF136-Protein zur Herstellung eines Antiserums

Für die Herstellung eines Expressionsklons wurde das gesamte HCF136-Leserahintergrund ohne Transitsequenz eingesetzt (vgl. Methodenteil 2.5.22.1). Das HCF136-Protein ließ sich in großen Mengen als Glutathion-S-Transferase-Fusionsprotein in *E. coli* rekombinant exprimieren (Abb. 7 linke Hälfte). Nach 3 Stunden Induktion durch IPTG ist das HCF136-GST-Fusionsprotein von 62 kD Größe das am stärksten akkumulierte Protein im Gesamtproteinextrakt. Untersuchungen ergaben, daß immerhin 40 % dieses Pools löslich waren, während 60 % in Einschlußkörperchen vorlagen. Damit war eine wichtige Voraussetzung erfüllt, um das Fusionsprotein affinitätschromatographisch mit Hilfe einer Glutathion-Sepharose aus einem löslichen Bakterienhomogenat aufzureinigen (Abb. 7 Mitte). Die Abspaltung des HCF136-Anteils mit einer Größe von 38 kD konnte bei dem verwendeten Fusionsproteinkonstrukt mit Hilfe der Endoprotease Thrombin herbeigeführt werden. Das so aufgereinigte HCF136-Protein enthielt allerdings noch Reste an Fusionsprotein, die sich auch nach wiederholter Affinitätschromatographie nicht entfernen ließen. Ferner konnten noch weitere Proteinbanden unterhalb von HCF136 nachgewiesen werden. Um die Aufreinigung des HCF136-Proteins zu verbessern wurde eine zusätzliche Gelelektion der vorgereinigten Fraktion durchgeführt (Abb. 7 rechter Teil).

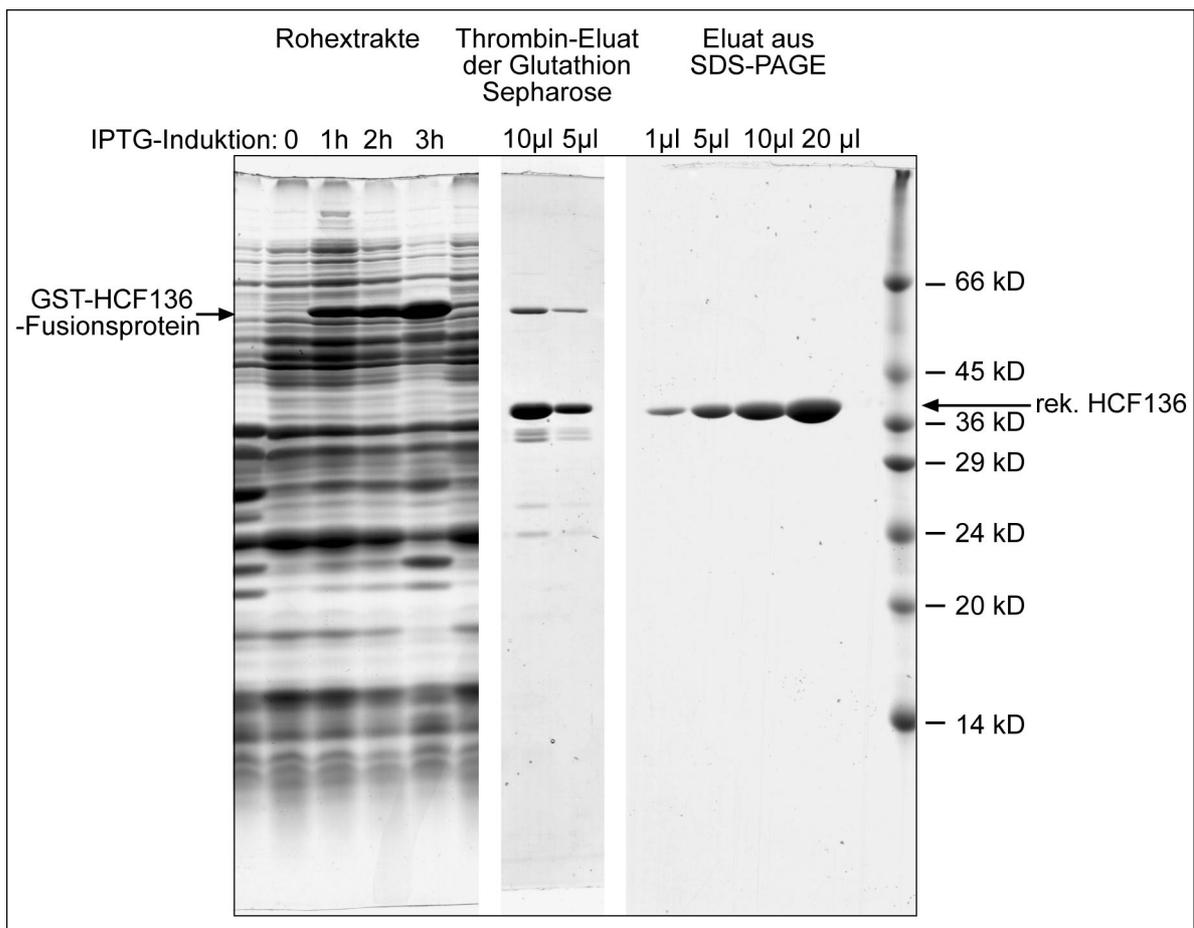


Abb. 7: Expression von rekombinantem HCF136 als Glutathion-S-Transferase-Fusionsprotein in *E. coli* (links) und anschließende Reinigung über Affinitätschromatographie an Glutathion-Sepharose und Thrombin-Abspaltung des HCF136-Anteils (Mitte) bzw. zusätzliche Gelelektion (rechts). Es sind jeweils Abschnitte aus Coomassie-gefärbten Polyacrylamidgelen gezeigt.

3.3.2 Die Spezifität des HCF136-Antiserums

Zunächst wurde das HCF136-Antiserum in einer Immunoblot-Analyse zum Nachweis kleinster Mengen an rekombinantem HCF136-Protein eingesetzt (Abb. 8A). Das unaufgereinigte HCF136-Antiserum reagiert mit hoher Empfindlichkeit gegen rekombinantes HCF136-Protein. Selbst 5 ng an Protein können auf dem Filter noch nachgewiesen werden. Das Präimmunserum lieferte erwartungsgemäß trotz doppelter Expositionszeit des Filters keine Banden. Beim Einsatz des HCF136-Antiserums gegen Proteinextrakte aus Pflanzen wurden auf den Western-Filtern neben einer deutlichen HCF136-Bande viele unspezifische Signale detektiert (ohne Abb.) Diese unspezifischen Kreuzreaktionen wurden auch mit dem Präimmunserum hervorgerufen. Offenbar waren die Kaninchen bereits gegen viele pflanzliche Proteine immunisiert. Aus diesem Grund wurde das HCF136-Antiserum mit Hilfe von rekombinantem HCF136-Protein affinitätsaufgereinigt. Das aufgereinigte Antiserum war spezifisch für HCF136 (Abb. 8B). Insbesondere in Membranextrakten konnte neben HCF136 auch bei langer Exposition der Filter kein unspezifisches Signal mehr nachgewiesen werden. Auf diese Weise war es möglich, HCF136 in Membranproteinextrakten von *Arabidopsis thaliana* (Wildtyp-Pflanzen), *Flaveria bidentis* und dem C4-Gras *Sorghum bicolor* eindeutig nachzuweisen. Erwartungsgemäß konnte in Extrakten der Mutante *hcf136* kein Protein identifiziert werden.

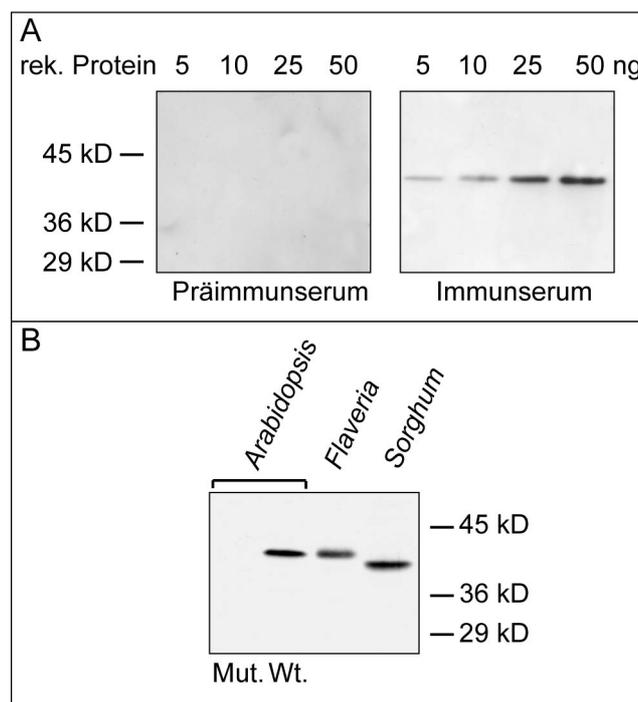


Abb. 8: Spezifitätstest für das HCF136-Antiserum. Dargestellt sind Röntgenfilmausschnitte nach Exposition von Westerntransfer-Membranen. A) Reaktion von Präimmunserum und nicht-aufgereinigtem HCF136-Antiserum gegen eine Verdünnungsserie von rekombinantem HCF136-Protein. B) Spezifitätstest des affinitätsaufgereinigten HCF136-Antiserums gegen Gesamtmembranproteinextrakte aus *Arabidopsis* (Wildtyp und Mutante) sowie aus *Flaveria bidentis* und *Sorghum bicolor* im Westernblot. Für die Gelelektrophorese wurden jeweils 30 µg Protein pro Bahn verwendet.

3.3.3 Das HCF136-Protein ist mit Thylakoiden assoziiert

Die Hydropathieberechnung für das HCF136-Protein zeigte, daß es sich um ein durchgehend hydrophiles Protein handelt, daß nur am Aminotermius einen ausgeprägten hydrophoben Abschnitt aufweist. Dieser reicht jedoch laut rechnerischer Vorhersage nicht für eine membrandurchspannende α -Helix aus und kann allenfalls als peripherer Membrananker dienen, sofern HCF136 äußerlich an eine Membran geheftet ist. Damit stellte sich zunächst die Frage, ob HCF136 Bestandteil des Stromas, der Thylakoide oder der Hüllmembranen ist. Um diese Frage zu klären, wurden Chloroplasten aus *Arabidopsis* bzw. Spinat fraktioniert und das HCF136-Protein in den einzelnen Fraktionen immunologisch nachgewiesen.

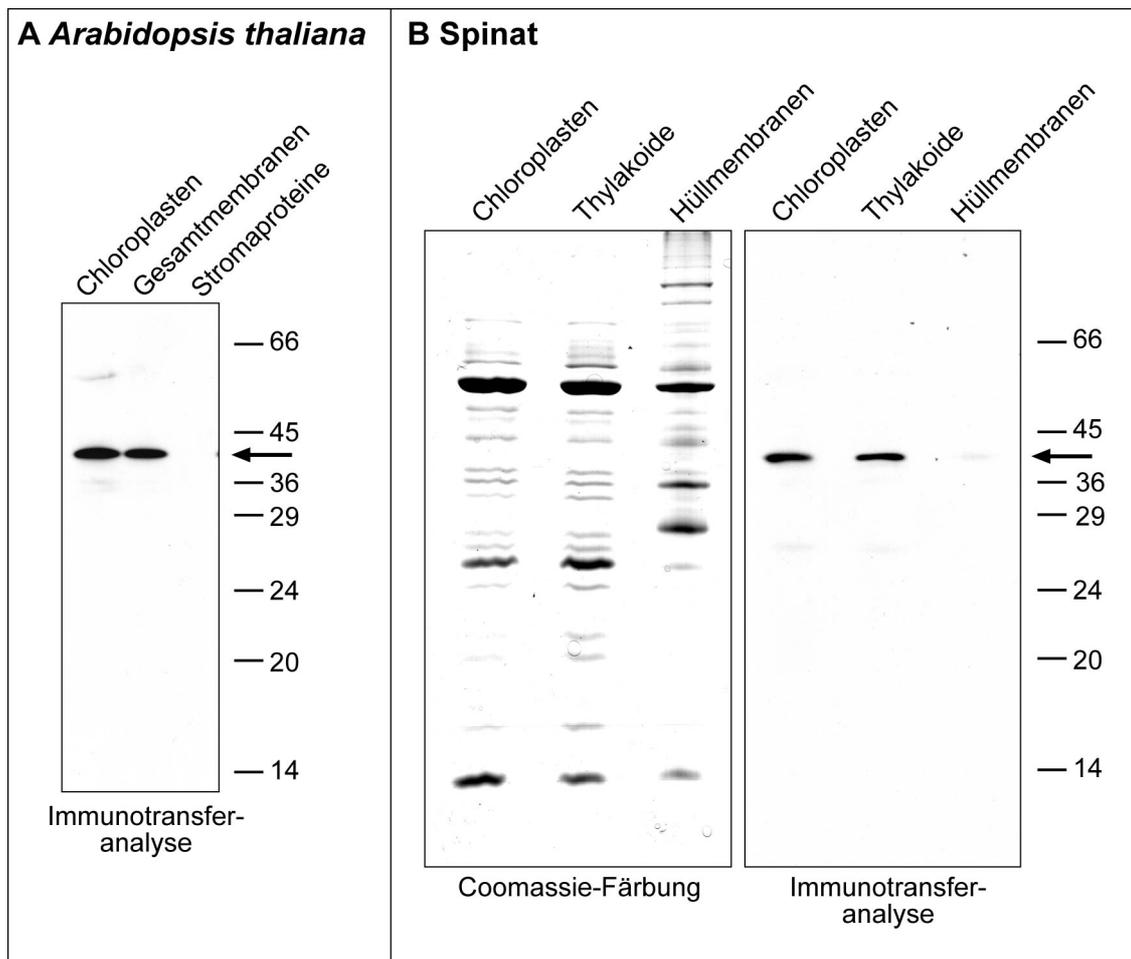


Abb. 9: Lokalisation von HCF136 in Chloroplasten von *Arabidopsis thaliana* und Spinat. A) Assoziation von HCF136 mit Gesamtmembranen von *A. thaliana*-Chloroplasten. Pro Fraktion wurden Proteine entsprechend 10 μ g Chlorophyll über SDS-PAGE aufgetrennt und das HCF136-Protein mit Hilfe der Immunotransferanalyse nachgewiesen. B) Assoziation von HCF136 mit Thylakoiden aus Spinat (Auftrennung von Thylakoiden und Hüllmembranen nach Cline *et al.*, 1984). Hierbei wurden jeweils 30 μ g Protein pro Bahn gelelektrophoretisch aufgetrennt und mit Hilfe der Coomassie-Färbung sichtbar gemacht bzw. das HCF136-Protein wurde über Immunoblot-Analyse nachgewiesen.

Zunächst wurden Chloroplasten von *Arabidopsis thaliana* lysiert und Gesamtmembranen und Stromaproteine voneinander getrennt (Abb. 9A). Im Westernblot konnte HCF136 in der erwarteten Größe von 38 kD in Chloroplasten nachgewiesen werden. Beim Import in die

Plastide wird offensichtlich die aminoternale Erweiterung vom Vorstufenprotein abgeschnitten, so daß das reife Protein um ca. 7 kD kleiner ist als rechnerisch für das Gesamtprotein vorhergesagt wurde. Nach der Fraktionierung ist HCF136 ausschließlich in der Membranfraktion zu finden. Dies deutet auf eine Assoziation mit Membranen hin. Da es kein Signal in der löslichen Stromafraktion gibt, kann es sich nicht um ein im Stroma frei lösliches Protein handeln. Um herauszufinden, mit welchen Chloroplastenmembranen HCF136 assoziiert ist, wurden Spinat-Chloroplasten in Thylakoide und Hüllmembranen getrennt und die Lokalisation von HCF136 untersucht (Abb. 9B). HCF136 war in dieser Untersuchung eindeutig mit Thylakoiden assoziiert. Ein schwaches Signal in der Hüllmembranfraktion ist wahrscheinlich auf eine etwa 10%-ige Kontamination dieser Membranen mit Thylakoidresten zurückzuführen.

3.3.4 Das HCF136-Protein ist ein peripheres Membranprotein, das sich durch Salzbehandlung von der Thylakoidmembran ablösen läßt

Die Ergebnisse aus 3.3.3 zeigten, daß HCF136 mit Thylakoiden assoziiert ist und offensichtlich nicht als frei löslicher Faktor vorkommt. Unter Berücksichtigung der Hydrophathie-Untersuchung sollte HCF136 demnach ein peripheres Membranprotein sein. Um dies zu bestätigen, wurden Thylakoide aus Spinat in salzfreiem Medium isoliert und dann in Gegenwart von unterschiedlichen Salzzusätzen beschallt. Anschließend wurde die jeweilige Suspension durch Ultrazentrifugation in das aus Membranvesikel bestehende Pellet und den löslichen Überstand getrennt. Bei dieser Prozedur werden lösliche und periphere Membranproteine je nach eingesetztem Salz mehr oder weniger von der Thylakoidmembran abgelöst und gelangen in den Überstand. Integrale Membranproteine wie Cytochrom f bleiben stets in der Membranfraktion, also im Pellet (Karnauchov *et al.*, 1997). Konkret konnte für die luminal lokalisierten extrinsischen Proteine PSII-23kD und PSII-16kD gezeigt werden, daß sie bei Zusatz von 250 mM NaCl von der Thylakoidmembran abgelöst werden (Åkerlund *et al.*, 1982; Ljungberg *et al.*, 1983). Der Einsatz von 1 M CaCl₂ vermag zusätzlich das luminale PSII-34kD-Protein vom Photosystem II freizusetzen (Ono & Inoue, 1983). Die Anwesenheit von 200 mM Na₂CO₃ führt zur Öffnung von Membranvesikeln und zur Freisetzung weiterer peripherer Membranproteine (Fujiki *et al.*, 1982). Die Beschallung bei diesen Salzwaschungen diente dazu, die abgeschlossenen Thylakoide zu gemischten Vesikeln zu überführen, um auch luminal Proteine der Salzeinwirkung auszusetzen. Durch die Beschallung entsteht eine etwa 50%-ige Mischung aus "Rightside-out" und "Inside-out"-Vesikeln der Thylakoidmembran.

Die Ergebnisse aus Abb. 10 zeigen, daß bei Beschallung von Thylakoiden in Medium ohne Salzzusatz der deutlich größere Anteil des HCF136-Proteins in der Membranfraktion verbleibt. Bei der Beschallung in Anwesenheit von 250 mM NaCl kehrt sich die Verteilung um, d.h. ein Großteil des HCF136-Pools liegt nun im Überstand vor. Bei Anwesenheit von 200 mM Na₂CO₃, liegt sämtliches Protein im Überstand vor. Das gleiche gilt für die Beschallung in 1 M CaCl₂. HCF136 zeigt somit das gleiche Verhalten wie die luminalen Proteine PSII-34kD, PSII-23kD und Plastocyanin, die – zumindest zu einem großen Anteil – peripher an die Membran gebunden sind (Hashimoto *et al.*, 1996). Bei 200 mM Na₂CO₃ und 1 M CaCl₂ wird die Vesikelstruktur der Thylakoide sogar größtenteils zerstört, so daß letztendlich die Gesamtheit des luminalen Proteinpools in den Überstand überführt wird. Als weitere Kontrolle dient das Cytochrom f - Protein, daß als integrales Membranprotein stets in der Membranphase verbleibt. Die Salzwaschung von beschallten Thylakoiden zeigt somit, daß HCF136 peripher an die Thylakoidmembran gebunden ist. Da durch Salzzusätze hauptsächlich ionische Interaktionen gestört werden, sollte aufgrund der Ergebnisse HCF136 über solche Salzbrücken an die

Membran gebunden sein. Dies kann sowohl durch Interaktionen mit der polaren Seite der Membranphospholipide als auch durch ionische Protein-Protein-Interaktionen gewährleistet werden. Es ist aber nicht ausgeschlossen, daß der aminoternale hydrophobe Abschnitt des Proteins zusätzlich als Membrananker dient.

Neben HCF136 wurden auch die Proteine Ycf39 (vgl. Driemel, 2000) und HCF164 (vgl. K. Lennartz, eingereichtes Manuskript 2000) auf Assoziation mit Thylakoidmembranen untersucht. Beide Proteine zeigten das gleiche Verhalten wie Cytochrom f, d.h. sie ließen sich durch Salzbehandlung beschallter Thylakoide nicht von der Membranphase ablösen und scheinen daher integrale Membranproteine darzustellen.

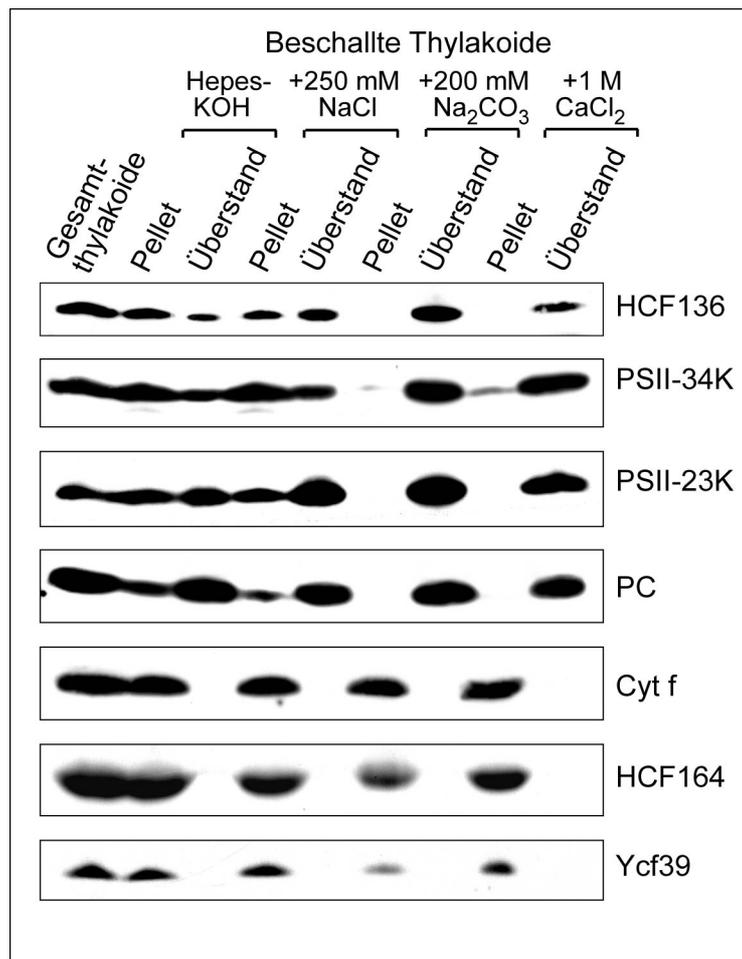


Abb. 10: Beschallung von Spinat-Thylakoiden in unterschiedlichen Salzbedingungen und anschließende Lokalisation von HCF136, HCF164, Ycf39 und Kontrollproteinen in Pellet- oder Überstandsfraktionen. Es wurde jeweils eine Proteinmenge entsprechend 10 µg Chlorophyll pro Bahn eingesetzt.

3.3.5 Das HCF136-Protein befindet sich auf der luminalen Seite der Thylakoidmembran

Die bisherigen Lokalisationsexperimente verdeutlichten, daß HCF136 ein peripheres Thylakoidmembranprotein darstellt. Sie erlaubten jedoch noch keine Aussage über die Orientierung des Proteins an der Membran. Um festzustellen, von welcher Seite HCF136 an die Thylakoidmembran gebunden wird, wurden Proteolyse-Experimente mit Thermolysin bei intakten und beschallten Spinat-Thylakoiden durchgeführt (Abb. 11). Bei intakten Thylakoiden sind periphere Membranproteine auf der stromalen Seite unmittelbar der Proteaseeinwirkung

ausgesetzt. Entsprechend zeigt sich in der Immunoblot-Analyse bei der Ferredoxin-NADPH-Oxidoreduktase (FNR) schon nach 1 min Inkubation ein nahezu kompletter Verlust des Proteins durch Proteolyse (Abb. 11A). Das PsaD-Protein wurde ebenfalls schon nach 1 min Thermolysin-Inkubation um den stromalen Arm verkürzt, das verbleibende integrale Membranprotein ist im Immunoblot entsprechend um ca. 3 kD kleiner geworden. Die luminalen Proteine PSII-34kD und PSII-23kD hingegen zeigen zumindest in den ersten 20 min der Thermolysin-Inkubation keinerlei Reduktion durch Proteolyse. Thermolysin kann nicht durch die Membran hindurchdringen bzw. Transmembranbereiche angreifen (Cline *et al.*, 1984). Bei längeren Inkubationszeiten bei Raumtemperatur wurde die Membran allerdings zunehmend geschädigt und damit durchlässig, so daß die luminalen Proteine nach 20 min Proteaseinkubation auch reduziert werden. HCF136 zeigt nun das gleiche Verhalten wie die beiden luminalen Proteine, d.h. es ist bei intakten Thylakoiden mindestens 15 min lang vor Proteolyse geschützt.

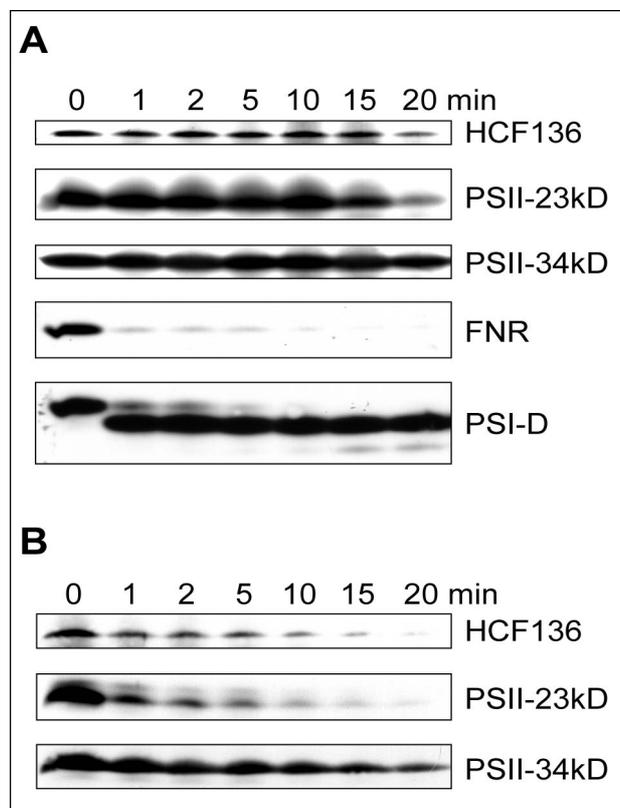


Abb. 11: Thermolysin-Behandlung von intakten (A) und beschallten (B) Spinat-Thylakoiden. Das Ausmaß der Proteolyse von HCF136 und Kontrollproteinen wurde in einer Zeitkinetik verfolgt. Es wurde jeweils eine Proteinmenge entsprechend 10 µg Chlorophyll pro Bahn eingesetzt.

Bei beschallten Thylakoiden dagegen werden schon nach 1 min Thermolysin-Inkubation die in den Inside-out-Vesikeln vorliegenden Anteile vom PSII-23kD-Protein und vom HCF136-Protein rasch proteolytisch abgedaut, während der restliche Pool dieser Proteine in den Rightside-out-Vesikeln mind. 15 min lang geschützt bleibt (Abb. 11B). Abweichend davon zeigt das PSII-34kD-Protein nicht diese deutliche Reduktion. Eventuell ist das 34kD-Protein resistenter gegenüber Thermolysin oder es wird an der Thylakoidmembran durch PSII-23kD- und PSII-16kD-Proteinen sterisch geschützt, so daß die Protease nicht unmittelbar angreifen kann. Insgesamt spricht dieses Experiment eindeutig für eine Lokalisation von HCF136 auf der luminalen Seite der Thylakoidmembran.

3.3.6 Das HCF136-Protein ist in den Stromathylakoiden lokalisiert

Die Thylakoidmembran ist lateral heterogen gestaltet und gliedert sich in Stromalamellen und Granastapel. Daher sollte untersucht werden, in welchen Bereichen der Thylakoidmembran HCF136 nachgewiesen werden kann. Thylakoide wurden entsprechend ihrer Topologie im Chloroplasten in Grana- und Stromalamellen fraktioniert (Wollenberger *et al.*, 1994). Die Grana wurden außerdem noch in Grana-Kernpartikel und Grana-Randbereiche getrennt. Die Immunoblot-Analyse (Abb. 12) zeigt, daß nahezu das gesamte HCF136-Protein in den freien Stromalamellen bzw. in geringen Anteilen in den Grana-Randbereichen organisiert ist. Damit steht fest, daß HCF136 nicht Bestandteil eines fertigen PS II-Komplexes sein kann, denn photosynthetisch aktives PS II ist mehrheitlich in den Granastapeln angeordnet (Anderson 1986; Guenther & Melis, 1990; Melis, 1991; Anderson, 1992). In den Stromalamellen findet allerdings die Assemblierung des Photosystems II statt (Aro *et al.*, 1993; van Wijk *et al.*, 1996). Somit ist diese Lokalisation ein Indiz für die Funktion von HCF136 als möglicher Assemblierungsfaktor.

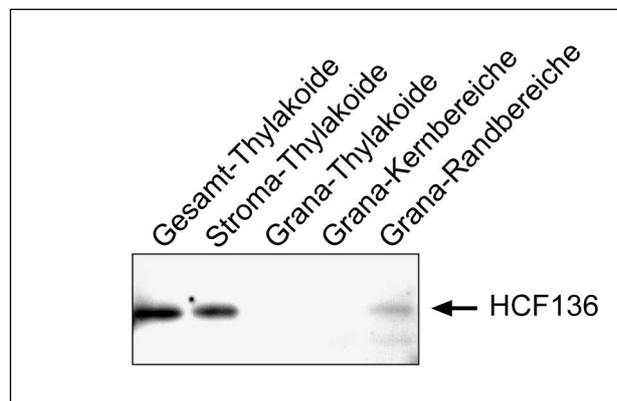


Abb. 12: Intrathylakoidale Lokalisation von HCF136. Lokalisation von HCF136 in verschiedenen Thylakoid-Subfraktionen nach Wollenberger *et al.* (1994). Es wurde jeweils eine Proteinmenge entsprechend 2.5 µg Chlorophyll pro Bahn verwendet.

3.4 Der Importweg des HCF136-Proteins

Die aminoterminaler Erweiterung des HCF136-Proteins im Vergleich zu den homologen Proteinen aus *Synechocystis* und *Anabaena* (vgl. Abb. 5) ist schon im Abschnitt 3.2 als Transitsequenz gedeutet worden, die das Protein nach der Synthese im Cytosol für den Import in die Plastide markiert. Diese Transitsequenz zeigt einen zweigeteilten Aufbau, der für Proteine typisch ist, die in das Thylakoidlumen importiert werden müssen (Robinson *et al.*, 1998). Ferner zeigen beide Teile den für Transitsequenzen typischen modularen Aufbau (Heijne *et al.*, 1989). Der erste Teil, der offensichtlich für den Import in das Stroma notwendig ist und von Aminosäure 1-53 reicht, beginnt wie viele Plastiden-Transitsequenzen mit „MA“ (Joshi, 1987; Lütcke, 1987). Ferner besitzen die ersten 17 AS fast ausschließlich ungeladene, hydrophobe Seitenketten. Es folgt ein längerer hydrophiler Abschnitt mit sehr vielen Serin- und Prolin-Positionen (vgl. Keegstra & Olsen, 1989, de Boer & Weisbeek, 1990). Normalerweise endet eine Stromatransitsequenz mit einem dritten Abschnitt, der die Neigung zur Bildung eines amphiphilen β -Faltblattes hat und mit der allgemeinen Konsensus-Sequenz für die stromale Protease (V/I-X-A/C<>A) (Gavel & Heijne, 1990) abschließt. Beide Elemente können in HCF136

nicht identifiziert werden. Vielmehr geht die Transitsequenz direkt in einen zweiten Teil über, der offensichtlich für den Import in das Thylakoidlumen essentiell ist und bei allen Ycf48-Sequenzen vorhanden ist. Dieser Teil beginnt mit einem kurzen Abschnitt von 5-10 Aminosäuren, die bevorzugt basische Seitenketten enthalten. Bei HCF136 befindet sich hier anders als bei den restlichen Ycf48-Proteinen ein Zwillingsarginin-Motiv. Dieses Motiv ist typisch für Proteine, die über den Δ pH-Weg (Henry *et al.*, 1997) in das Thylakoidlumen importiert werden. Es folgt ein hydrophober Abschnitt von 15 Aminosäuren (H-Domäne) und schließlich die Konsensus-Sequenz für eine Prozessierung im Lumen (A-X-A<>X). Diese liegt bei HCF136 als „A-R-A-D“-Motiv vor. Die Transitsequenz endet damit bei Position 78 (Abb. 5).

3.4.1 HCF136 wird bei höheren Pflanzen ausschließlich über den Δ pH-Weg in das Lumen der Thylakoide importiert

Das Zwillingsarginin-Motiv in der HCF136-Präsequenz deutete an, daß der Transport dieses Proteins in das Thylakoidlumen wie z.B. beim PSII-23kD-Protein über den Δ pH-abhängigen Tat-Weg erfolgt. Um dies zu überprüfen, wurden Importexperimente mit dem HCF136-Vorläuferprotein in Erbsenplastiden durchgeführt.

Die Importversuche sind in Abb. 13 dokumentiert. Die *in vitro*-Synthese des HCF136-Vorläuferproteins lieferte ein Protein in der erwarteten Größe (prä-prä-HCF136). Allerdings wurde zusätzlich noch ein höhermolekulares Produkt synthetisiert, so daß das Vorläuferprotein stets als Doppelbande erscheint. Der Import dieses Vorläuferproteins in Erbsenplastiden konnte erfolgreich gezeigt werden (Abb. 13A links, Bahn C). Nach erfolgtem Import kann überschüssiges Vorläuferprotein außerhalb der Plastide durch Thermolysin entfernt werden. Der importierte Proteinpool bleibt dagegen geschützt (Bahn C+). Das importierte HCF136-Protein besteht aus zwei Fraktionen mit unterschiedlicher Größe. Nach Trennung der Plastiden in Stroma- und Thylakoidfraktionen kann man das höhermolekulare Produkt eindeutig dem HCF136 nach erster Prozessierung zuordnen (prä-HCF136). Hier wurde also nur der erste Teil der zweigeteilten Transitsequenz abgespalten. Dieses Protein befindet sich dementsprechend in der Stromafraktion. Das niedermolekulare Produkt (HCF136) hingegen ist ausschließlich in der Thylakoidfraktion enthalten und konnte auch durch Thermolysin-Zugabe (T+) nicht abgebaut werden. Es ist folglich im Thylakoidlumen geschützt und entspricht dem HCF136-Protein nach vollständiger Entfernung der gesamten Transitsequenz. Auf diese Weise konnten die Lokalisationsergebnisse vom Abschnitt 3.3 durch ein unabhängiges Experiment bestätigt werden: HCF136 ist offensichtlich im Thylakoidlumen lokalisiert.

Alle folgenden Experimente konzentrierten sich auf die Klärung der Frage des Importweges in das Thylakoidlumen. Durch Zugabe von Natriumazid wird der thylakoidale Sec-Importweg gehemmt (Haward *et al.*, 1997). Dies hatte im Experiment keinen Einfluß auf den Import von HCF136 in das Thylakoidlumen (Abb. 13A Mitte). HCF136 wird somit nicht über den Sec-Weg in das Lumen transportiert, sondern folgt offenbar dem Tat-Weg. Um dies zu belegen, wurden folgende Experimente durchgeführt: Das PSII-23kD-Protein ist ein Substrat des Tat-Weges. Werden hohe Mengen vom 23kD-Vorläuferprotein (prä-prä-PSII-23kD) zu Plastiden gegeben, kommt es zur Konkurrenz mit anderen Substraten des Tat-Weges. Im Experiment konnte nun gezeigt werden, daß der Import von HCF136 in das Thylakoidlumen unter diesen Bedingungen vollständig gehemmt wird, obgleich der Import in das Stroma ohne Probleme verläuft (Abb. 13A rechts). Offensichtlich verwendet HCF136 den gleichen Transportmechanismus wie das 23kD-Protein.

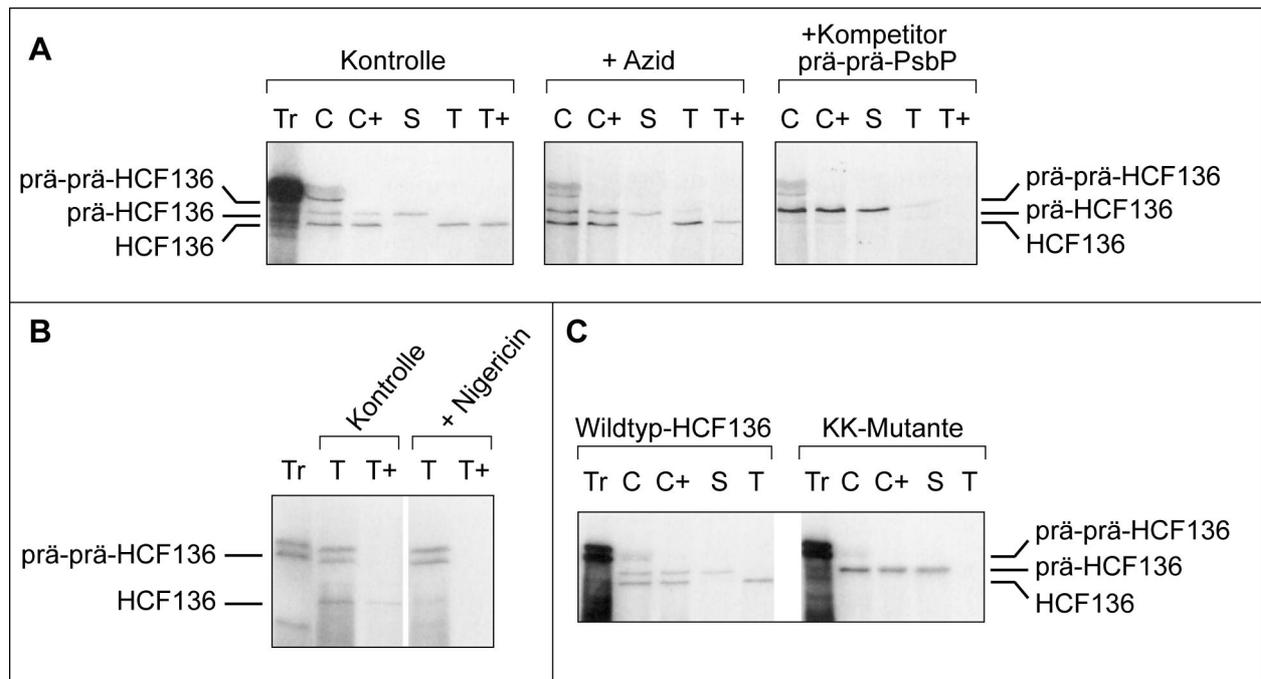


Abb. 13: Importversuche von HCF136 in Erbse-Chloroplasten. A) HCF136 wurde über *in vitro* Transkription /-Translation in Gegenwart von ^{35}S -Methionin synthetisiert (Tr) und mit intakten Erbse-Chloroplasten inkubiert. Bei der Kontrolle wurde kein Hemmstoff eingesetzt. Zur Hemmung des Imports wurde ad 10 mM Natriumazid zugegeben bzw. 3 μM prä-prä-23kD-Protein als Kompetitor eingesetzt. Nach der Inkubation wurden Gesamtchloroplasten (C), Stromafraktion (S) und Thylakoidfraktion (T) ohne oder mit Thermolysin (+) inkubiert, auf einem SDS-PAGE aufgetrennt und schließlich eine Autoradiographie auf Röntgenfilm angefertigt. B) Nach *in vitro*-Transkription/-Translation wurde HCF136 mit Thylakoiden inkubiert, wobei durch Zugabe von Nigericin der ΔpH -Gradienten abgebaut wurde. Die Thylakoide wurden anschließend ohne oder mit Thermolysin 30 min auf Eis inkubiert. C) Auswirkungen der Mutagenese des Zwillingsarginin-Motives in HCF136 auf das Importverhalten. Über *in vitro*-Transkription/-Translation ausgehend von der Wildtyp-cDNA bzw. einem Konstrukt mit Austausch des Zwillingsarginin durch ein Zwillingslysin wurde HCF136 synthetisiert und mit Erbse-Chloroplasten wie in A inkubiert.

Der Tat-Transportweg ist von einem pH-Gradienten an der Thylakoidmembran abhängig. Der Hemmstoff Nigericin wird eingesetzt, um den pH-Gradienten an der Thylakoidmembran abzubauen und somit den Tat-Transportweg eines Substrates zu überprüfen. HCF136 wurde auch in das Thylakoidlumen importiert, wenn man Vorläuferprotein direkt zu isolierten Thylakoiden gegeben hat (Abb. 13B). In diesem Fall wird die Transitsequenz offensichtlich direkt in einem Schritt entfernt. Durch Zugabe von Nigericin hingegen kann der Import in das Lumen vollständig gehemmt werden und bestätigt damit den postulierten Tat-Weg.

Bei einem dritten Experiment sollte die Bedeutung des Zwillingsarginin-Motivs für den Transportweg über die Tat-Translokase verifiziert werden. Dazu wurde ein Vorläuferprotein von HCF136 synthetisiert, bei dem das Zwillingsarginin durch ein Zwillingslysin ersetzt worden ist. In diesem Fall kann kein Import in das Thylakoidlumen mehr beobachtet werden (Abb. 13C). Im Stroma akkumuliert die einfach prozessierte Form des Proteins (prä-HCF136).

Zusammengefaßt zeigen die Importexperimente, daß HCF136 offensichtlich *ausschließlich* den ΔpH -Weg als Importweg in das Thylakoidlumen verwendet. Sobald dieser Transportmechanismus gehemmt wird bzw. sobald das Zwillingsarginin-Motiv nicht mehr vorhanden ist, kann HCF136 *in vitro* nicht mehr in das Lumen importiert werden.

3.4.2 Mutagenese von Untereinheiten der Tat-Translokase in *Synechocystis spec.*

Der Import des HCF136-Proteins in das Thylakoidlumen folgt bei höheren Pflanzen dem Δ pH-abhängigen Tat-Weg. Es war nun von großem Interesse, den Transportmechanismus des homologen Ycf48-Proteins in das Thylakoidlumen bei Cyanobakterien aufzudecken. Analoge Importexperimente lassen sich bei Cyanobakterien nicht durchführen, da die einzelnen Hemmschritte nicht quantitativ ablaufen (Prof. C. Robinson, pers. Mitteilung). Daher wurde alternativ versucht, das *in vitro* synthetisierte Ycf48-Protein aus *Synechocystis spec.* PCC6803 in intakte Thylakoide aus Erbsenplastiden zu importieren. Dies war jedoch nicht möglich. Um also letztendlich den Importweg bei Cyanobakterien zu untersuchen, wurde der Versuch unternommen, Mutanten aus *Synechocystis* zu erzeugen, die in der Tat-Translokase betroffen sind. Es gab zu diesem Zeitpunkt bereits die Mais-Mutanten *hcf106* (Voelker & Barkan, 1995) und *tha4* (Walker *et al.*, 1999), bei denen die kernkodierten Gene *HCF106* bzw. *THA4* ausgeschaltet waren, so daß der Lumenimport von Proteinen über den Δ pH-Weg in Plastiden dieser Mutanten vollständig gestört war. Zum *HCF106*-Gen gibt es in *Synechocystis* zwei homologe Gene, die man als *tatA* (ssl2823) bzw. *tatB* (slr1046) bezeichnet hat. *THA4* zeigt Sequenzähnlichkeit zum HCF106-Protein und damit auch zu den beiden cyanobakteriellen Genen *tatA* und *tatB*. Es wurden nun Deletionskonstrukte von beiden Genen aus *Synechocystis* erzeugt, bei denen jeweils der zentrale Teil des Leserahmens durch ein Kanamycin- bzw. Chloramphenicol-Resistenzgen ersetzt worden ist. *Synechocystis spec.* PCC6803 wurde mit diesen Deletionskonstrukten transformiert, wobei im ausgesuchten Stamm doppelte homologe Rekombination möglich war (Thiel, 1994). Durch Anzucht auf antibiotikahaltigen Nährmedien können so Bakterienklone selektioniert werden, bei denen das intakte Gen durch ein Deletionskonstrukt ersetzt wurde. Leider zeigte sich im konkreten Fall der Tat-Mutagenese, daß die erfolgreich transformierten *Synechocystis*-Klone schon den zweiten Segregationszyklus nicht überlebten. Vielmehr bleichten sie schon bei einer Lichtstärke von $20 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ nach wenigen Tagen gelblich aus und konnten nicht erhalten werden. Offensichtlich wirkt sich die Mutation in der Tat-Translokase letal aus. Es war somit nicht möglich, den Importweg des Ycf48-Proteins in *Synechocystis* zu untersuchen.

3.5 Der funktionelle Zusammenhang des HCF136-Proteins mit dem Photosystem II

3.5.1 Die Reduktion der PS I-Proteine in *hcf136* ist ein sekundärer Effekt - die Lichtabhängigkeit der Pegel photosynthetischer Membrankomplexe in *hcf*-Mutanten

Die bisherige Charakterisierung der Mutante *hcf136* (Meurer, 1996) deckte nicht nur eine drastische Reduktion der Proteinspiegel repräsentativer Untereinheiten des Photosystems II auf. Vielmehr konnte ebenso eine deutliche Reduktion in der Akkumulation des PS I-Kernkomplexes nachgewiesen werden, wengleich die noch vorhandenen PS I-Komplexe laut spektroskopischer Messungen im Gegensatz zum Photosystem II funktionsfähig waren. Die Frage, ob es sich bei der Reduktion des PS I um einen Sekundäreffekt oder um eine primäre Auswirkung der Mutation handelt, konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden. Es handelt sich hierbei um ein generelles Problem bei der Charakterisierung von Mutanten des PS II (Felder, 1999) und des Cytochrom b_6f -Komplexes (Lennartz *et al.*, eingereichtes Manuskript 2000). Insofern sollte eine vergleichende Charakterisierung von *hcf*-Mutanten des Photosystems II,

des Photosystems I und des Cytochrom b_6f -Komplexes von *Arabidopsis thaliana* bei unterschiedlichen Lichtbedingungen durchgeführt werden.

Mit Hilfe der Immunoblot-Analyse wurden die Spiegel repräsentativer Untereinheiten des PS II, des PS I und des Cytochrom b_6f -Komplexes in verschiedenen *hcf*-Mutanten und einer Wildtyp-Verdünnungsserie gemessen (Abb. 14). Die verwendeten Mutanten waren nach bisherigen Untersuchungen primär im Photosystem II (*hcf136*, *hcf173*, *hcf154* und *hcf107*), im Photosystem I (*hcf145*) oder im Cytochrom b_6f -Komplex (*hcf164*) betroffen. Für die Mutante *hcf136* konnte nach bisherigen Daten ein Defekt in der Biogenese des Photosystem II auf posttranslationaler Ebene manifestiert werden (Meurer *et al.*, 1998). Die Mutante *hcf173* ist in der Stabilität der *psbA*-mRNA betroffen (Dr. K. Meierhoff, pers. Mitteilung) und zeigt damit eine verminderte Translation des D1-Proteins. Die allelischen Mutanten *hcf154* und *hcf107* sind in der Prozessierung des *psbB*-Operons betroffen (Felder, 1999), wobei *psbH*-haltige Transkripte mit freiem 5'-Ende instabil sind. Dies führt insbesondere zu einer drastisch verminderten *PsbH*-Synthese. Die Mutante *hcf154* ist dabei eine T-DNA-Insertionsmutante, während die Mutante *hcf107* durch EMS-Mutagenese hervorgegangen ist. Die Mutante *hcf145* ist in der Akkumulation der *psaA*-mRNA reduziert (Dr. J. Meurer, pers. Mitteilung). Bei der Mutante *hcf164* wiederum liegt ein posttranslationaler Defekt in der Biogenese des Cytochrom b_6f -Komplexes vor (Lennartz *et al.*, eingereichtes Manuskript 2000). Beim direkten Vergleich der Proteinspiegel von Mutanten, die unter sehr schwachen Lichtstärken ($2-5 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) bzw. unter normalen Lichtstärken ($50-70 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) in der Gewebekultur angezogen wurden, können folgende Ergebnisse abgeleitet werden:

Sowohl im Normallicht als auch im Schwachlicht zeigen die Mutanten *hcf136*, *hcf173*, *hcf154* und *hcf107* eine Reduktion der Photosystem II-Untereinheiten, während die Mutante *hcf145* im Photosystem I und die Mutante *hcf164* im Cytochrom b_6f -Komplex betroffen sind. Diese Reduktionen in den photosynthetischen Komplexen konnten somit als Primärdefekte bestätigt werden. Von allen hier beschriebenen PS II-Mutanten ist *hcf136* am stärksten betroffen. Bei der EMS-Mutante *hcf107* fällt auf, daß die Reduktion im PS II unter Schwachlicht moderater ausfällt als unter Normallicht. Hier liegt im betroffenen Gen eine Punktmutation ohne Leserasterverschiebung vor (Dr. A. Sane, pers. Mitteilung), die erst unter Normallichtbedingungen deutlich zum Tragen kommt. Es fällt auf, daß bei den PS II-Mutanten die Restmengen der PS II-Untereinheiten CP43 und D2 höher sind als die von CP47 und D1. Sämtliche PS II-Mutanten zeigen eine ähnlich ausgeprägte Reduktion in den Proteinspiegeln von PS I-A/B und PS I-D, und zwar sowohl unter Schwach- als auch unter Normallicht. Unter Schwachlicht erreicht die PS I-Akkumulation allerdings noch 50-75 % des Wildtyp-Spiegels, bei Normallicht hingegen werden nur noch zwischen 12.5 % und 25 % des Wildtyp-Niveaus erreicht. Damit wurde gezeigt, daß die Reduktion des PS I in PS II-Mutanten ein sekundärer Effekt ist, der vermutlich durch schädigende oxidative Prozesse aufgrund freien Chlorophylls oder Behinderung des linearen Elektronentransportes verursacht wird. Dies gilt unabhängig davon, ob der primäre Defekt im PS II sich translational oder posttranslational auswirkt. Eine Reduktion in *PetD* des Cytochrom b_6f -Komplexes kann bei den PS II-Mutanten nicht beobachtet werden.

Noch deutlicher wird eine sekundäre Reduktion des PS I bei der Cytochrom b_6f -Mutante *hcf164*, die unter Schwachlicht keine Reduktion im PS I zeigt, wohingegen unter Normallicht das PS I auf ca. 25 % des Wildtyps reduziert ist. Ein Defekt im Cytochrom b_6f -Komplex bewirkt unter Normallicht außerdem eine Reduktion im Photosystem II auf ca. 50-75 %. Die PS I-Mutante *hcf145* zeigt interessanterweise keine Reduktion im PSII bzw. in *PetD* des Cytochrom b_6f -Komplexes. Offensichtlich hat der Primärdefekt im PS I keine sekundären Auswirkungen. Insgesamt eignet sich dieser experimentelle Ansatz zur Identifizierung der primären und

sekundären Effekte bei *hcf*-Mutanten. Die Mutante *hcf136* ist primär in der Biogenese des PS II betroffen, während die Reduktion im PS I ein sekundärer Effekt der Mutation ist.

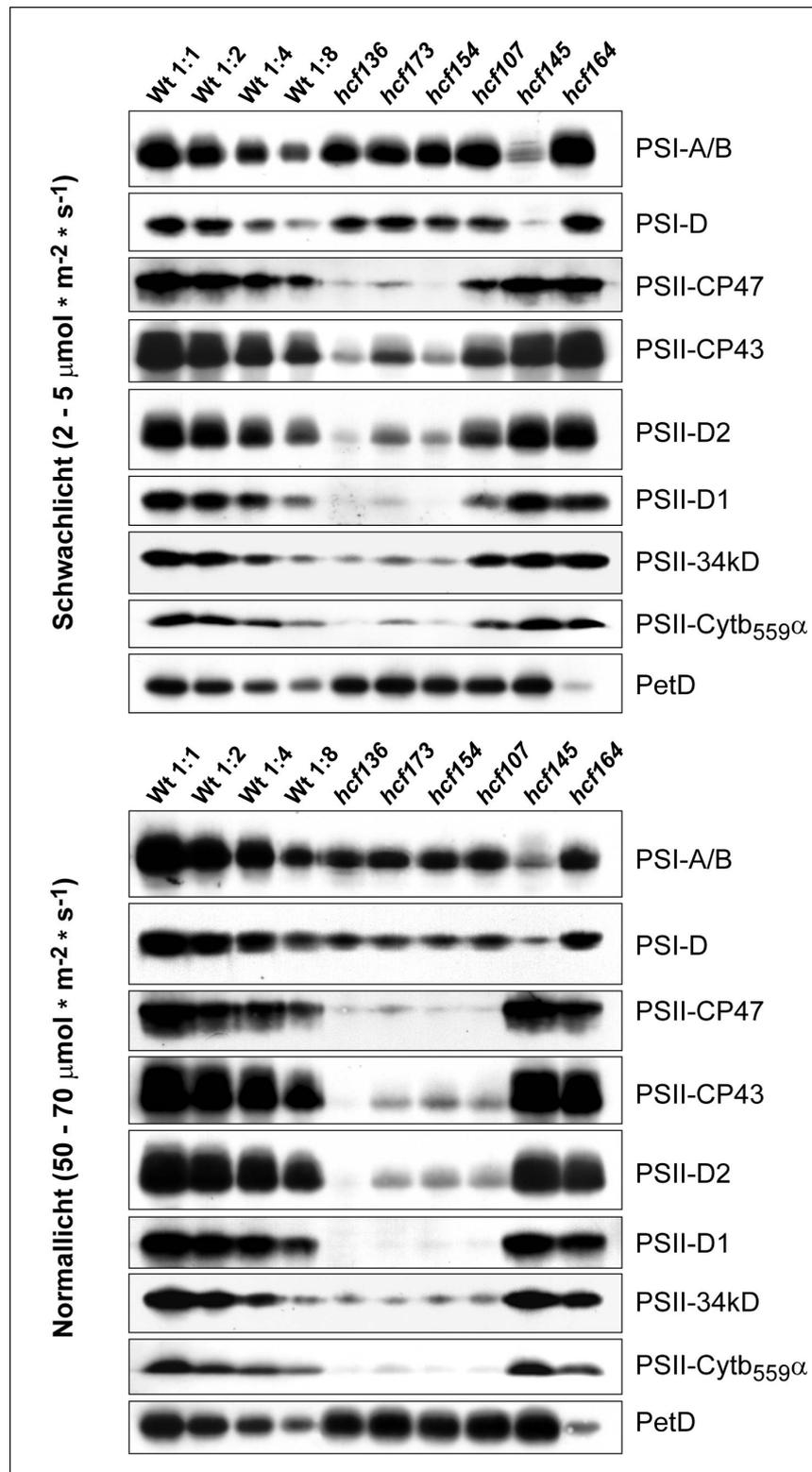


Abb. 14: Immunoblot-Analyse zur Messung der Proteinspiegel repräsentativer Untereinheiten des Photosystems I, des Photosystems II und des Cytochrom b_6f -Komplexes in Wildtyp-Pflanzen, in den PS II-Mutanten *hcf136*, *hcf173*, *hcf154* und *hcf107*, in der PS I-Mutante *hcf145* und in der Cytb₆-f-Mutante *hcf164* von *Arabidopsis thaliana* angezogen unter Gewebekulturbedingungen im Schwachlicht und im Normallicht. Es wurden jeweils Gesamtmembranen isoliert und 18 µg Protein bzw. beim Wildtyp eine entsprechende Verdünnungsreihe aufgetragen.

3.5.2 Analyse der photosynthetischen Pigmente in *hcf*-Mutanten

Die Analyse der Spiegel photosynthetischer Pigmente in den unter 3.5.1 charakterisierten *hcf*-Mutanten sollte zeigen, wie sich die gestörte Biogenese bestimmter Membrankomplexe auf die Pigmentakkumulation auswirkt. Die Verteilung der Chlorophylle und Carotinoide in den beiden Photosystemen bzw. der zugehörigen Lichtsammelkomplexe wurde in Ruban *et al.* (1994), Lee & Thornber (1995), Yamamoto & Bassi (1996), Zheleva *et al.*, 1996; und Barber (1998) beschrieben. Betrachtet man die Chlorophylle, so enthalten die Kernkomplexe von Photosystem I und II ausschließlich Chlorophyll a. Chlorophyll b kommt ausschließlich in den Lichtsammelkomplexen und äußeren Antennenproteinen vor. Aber auch hier ist Chlorophyll a das Hauptpigment. Von den Carotinoiden sind Neoxanthin, Violaxanthin, Antheraxanthin und Zeaxanthin ausschließlich in den äußeren Antennen und den Lichtsammelkomplexen verteilt. β -Carotin kommt auch in den Kernkomplexen der Photosysteme vor, wobei das meiste Pigment im PS I-Kernkomplex vorliegt. Lutein ist sowohl in den äußeren Antennen und in den LHC-Komplexen als auch im PS II-Kernkomplex verteilt.

Die Pigmentanalyse der Mutanten im Vergleich zum Wildtyp bei unterschiedlichen Lichtanzuchtbedingungen ist in Tabelle 5 zusammengefaßt und brachte folgende Ergebnisse: Bereits unter Schwachlicht-Bedingungen zeigen die PS II-Mutanten *hcf136*, *hcf173*, *hcf154* und *hcf107* eine mehr oder weniger starke Reduktion im Chlorophyllgehalt im Vergleich zum Wildtyp. Diese Reduktion ist am stärksten ausgeprägt bei der Mutante *hcf154* (55 % vom Wildtyp) und am schwächsten bei der dazu allelischen Mutante *hcf107* (83 % vom Wildtyp). Die Reduktion des Gesamtchlorophylls ist in erster Linie auf eine Reduktion des Chlorophylls a zurückzuführen. Auch die PS I-Mutante *hcf145* ist bereits im sehr schwachen Licht in der Chlorophyll a-Akkumulation betroffen (79 % vom Wildtyp). Keine Reduktion im Chlorophyll-Gehalt zeigt hingegen die Mutante *hcf164* unter sehr schwachen Lichtstärken. Neben den Chlorophyllen ist in den PS II- und PS I-Mutanten das β -Carotin schon im Schwachlicht erheblich reduziert. Diese Reduktion ist bei der Mutante *hcf154* am deutlichsten (46 % vom Wildtyp). Die übrigen Carotinoide zeigen bei den Mutanten (Ausnahme: *hcf154*) im Schwachlicht höhere Spiegel als der Wildtyp. Möglicherweise steht dies im Zusammenhang mit der Schutzfunktion, die diese Pigmente neben der Weiterleitung der Lichtenergie wahrnehmen (Demmig-Adams & Adams, 1996).

Bei Normallicht zeigen die PS II-Mutanten eine drastische Reduktion in den Chlorophyllen, wobei die Reduktion erwartungsgemäß im Chlorophyll a am stärksten ist. Insbesondere die Mutanten *hcf136* und *hcf154* zeigen sich hier stark betroffen (Chlorophyll a 33 % bzw. 36 % vom Wildtyp). Die Reduktion des Chlorophylls a ist in der PS I-Mutante *hcf145* unter Normallicht nicht so stark ausgeprägt wie in den PS II-Mutanten (65 % vom Wildtyp). Interessanterweise ist auch die Cytochrom b_6/f -Mutante *hcf164* unter Normallicht deutlich in der Chlorophyll-Akkumulation betroffen (62 % vom Wildtyp). Insgesamt bestätigt die Reduktion der Chlorophyll-Spiegel in den Mutanten bei den unterschiedlichen Lichtbedingungen die Ergebnisse der Proteinspiegel der Membrankomplexe (siehe 3.5.1).

Tab. 5: Akkumulation photosynthetischer Pigmente in Wildtyp-Pflanzen, den PS II-Mutanten *hcf136*, *hcf173*, *hcf154* und *hcf107*, der PS I-Mutante *hcf145* und der Cyt b_6/f -Mutante *hcf164* von *Arabidopsis thaliana* bei Schwachlicht und Normallicht unter Gewebekultur-Bedingungen. Die Konzentration ist in pmol Pigment pro mg Membranprotein angegeben.
SD ... Standardabweichung, Diff. SL-NL ... Unterschied der Normallicht-Akkumulation bezogen auf den Wert bei Schwachlicht in Prozent.

	Lichtstärke						Diff. SL-NL
	2-5 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$			50-70 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$			
Wildtyp	Konz.	SD	% vom Wt	Konz.	SD	% vom Wt	
Chlorophyllid a	27,75	1,41	100%	56,85	2,10	100%	104,9%
Neoxanthin	7,39	0,94	100%	11,19	0,69	100%	51,3%
Violaxanthin	7,01	0,98	100%	11,10	0,72	100%	58,4%
Antheraxanthin	0,00	0,00	/	0,33	0,32	100%	33,0%
Lutein	23,33	1,86	100%	32,75	1,33	100%	40,4%
Gesamt-Chlorophyll	143,75	7,44	100%	205,07	11,92	100%	42,7%
Chlorophyll b	42,03	2,63	100%	61,65	4,45	100%	46,7%
Chlorophyll a	101,72	6,36	100%	143,42	5,18	100%	41,0%
β -Carotin	11,23	1,09	100%	22,63	1,00	100%	101,6%
Violaxanthin+Antheraxanthin+Zeaxanthin	7,01	0,98	100%	11,43	0,85	100%	63,1%

hcf136	Konz.	SD	% vom Wt	Konz.	SD	% vom Wt	Diff. SL-NL
Chlorophyllid a	25,67	1,47	93%	42,17	2,14	74%	64,3%
Neoxanthin	8,92	0,28	121%	9,36	0,95	84%	5,0%
Violaxanthin	10,96	0,93	156%	11,62	0,84	105%	6,0%
Antheraxanthin	0,33	0,22	/	0,32	0,30	94%	-5,4%
Lutein	27,08	1,12	116%	27,10	3,15	83%	0,1%
Gesamt-Chlorophyll	101,98	8,35	71%	78,09	2,33	38%	-23,4%
Chlorophyll b	37,20	1,70	88%	30,44	1,78	49%	-18,2%
Chlorophyll a	64,78	1,18	64%	47,65	2,78	33%	-26,4%
β -Carotin	6,98	0,57	62%	6,68	0,66	30%	-4,2%
Violaxanthin+Antheraxanthin+Zeaxanthin	11,30	0,99	161%	11,93	1,12	104%	5,6%

hcf173	Konz.	SD	% vom Wt	Konz.	SD	% vom Wt	Diff. SL-NL
Chlorophyllid a	25,75	1,48	93%	37,27	2,10	66%	44,7%
Neoxanthin	9,51	0,41	129%	10,56	1,17	94%	11,1%
Violaxanthin	10,16	1,08	145%	11,15	1,27	100%	9,8%
Antheraxanthin	0,34	0,35	/	0,61	0,48	181%	78,4%
Lutein	27,18	1,44	117%	30,07	2,46	92%	10,6%
Gesamt-Chlorophyll	120,30	5,17	84%	122,52	7,65	60%	1,8%
Chlorophyll b	43,10	2,31	103%	44,56	2,56	72%	3,4%
Chlorophyll a	77,20	4,13	76%	77,96	4,48	54%	1,0%
β -Carotin	7,01	0,55	62%	6,58	0,59	29%	-6,2%
Violaxanthin+Antheraxanthin+Zeaxanthin	10,50	1,33	150%	11,76	1,16	103%	12,0%

hcf154	Konz.	SD	% vom Wt	Konz.	SD	% vom Wt	Diff. SL-NL
Chlorophyllid a	22,89	1,50	82%	27,32	1,76	48%	19,4%
Neoxanthin	7,24	0,42	98%	8,49	0,89	76%	17,3%
Violaxanthin	7,05	0,78	101%	9,07	0,45	82%	28,7%
Antheraxanthin	0,20	0,29	/	0,53	0,39	159%	164,5%
Lutein	20,80	1,29	89%	25,74	1,36	79%	23,8%
Gesamt-Chlorophyll	79,21	8,42	55%	83,16	5,77	41%	5,0%
Chlorophyll b	29,67	2,20	71%	31,69	2,32	51%	6,8%
Chlorophyll a	49,54	3,67	49%	51,47	2,28	36%	3,9%
β -Carotin	5,15	0,43	46%	5,66	0,51	25%	10,0%
Violaxanthin+Antheraxanthin+Zeaxanthin	7,25	1,06	103%	9,60	0,81	84%	32,4%

hcf107	Konz.	SD	% vom Wt	Konz.	SD	% vom Wt	Diff. SL-NL
Gesamt-Chlorophyll	119,49	12,40	83%	84,86	3,33	41%	-29,0%

hcf145	Konz.	SD	% vom Wt	Konz.	SD	% vom Wt	Diff. SL-NL
Chlorophyllid a	25,77	1,56	93%	44,99	2,04	79%	74,6%
Neoxanthin	8,09	0,52	109%	11,46	0,71	102%	41,6%
Violaxanthin	8,92	0,57	127%	13,13	0,36	118%	47,2%
Antheraxanthin	0,04	0,06	/	1,21	0,91	362%	2794,5%
Lutein	24,67	1,38	106%	37,03	1,27	113%	50,1%
Gesamt-Chlorophyll	112,96	13,20	79%	136,08	7,19	66%	20,5%
Chlorophyll b	35,58	2,14	85%	42,96	2,50	70%	20,7%
Chlorophyll a	77,38	4,65	76%	93,12	5,42	65%	20,4%
β -Carotin	5,57	0,40	50%	12,02	0,99	53%	115,8%
Violaxanthin+Antheraxanthin+Zeaxanthin	8,96	0,63	128%	14,34	1,25	125%	60,0%

hcf164	Konz.	SD	% vom Wt	Konz.	SD	% vom Wt	Diff. SL-NL
Gesamt-Chlorophyll	158,93	17,11	111%	127,92	3,61	62%	-19,5%

Parallel zu den Chlorophyllen ist unter Normallicht das β -Carotin in den Mutanten deutlich reduziert (z.B. *hcf154*: 25 % vom Wildtyp). Die übrigen Carotinoide sind unter Normallicht bei den PS II-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp leicht reduziert. Lediglich beim Antheraxanthin zeigen sich hier höhere Spiegel als beim Wildtyp. Bei der PS I-Mutante *hcf145* ist unter Normallicht ebenfalls ein höherer Xanthophyllspiegel als im Wildtyp erkennbar.

Wenn man die Absolutwerte der Pigmentspiegel im Schwach- und im Normallicht miteinander vergleicht, so fällt auf, daß die Mutanten *hcf136*, *hcf164* und *hcf107* im Gegensatz zu den übrigen Mutanten und im Vergleich zum Wildtyp einen deutlichen Rückgang im Chlorophyllgehalt aufweisen. Für die Mutante *hcf164* läßt sich dies sehr leicht mit den bei den Proteinspiegel-Analysen beschriebenen Sekundäreffekten auf PS I und PS II erklären, die erst bei Normallicht auftreten. Der mutante Phänotyp der Punktmutante *hcf107* wirkt sich ebenso erst unter Normallicht deutlich aus. Bei der Mutante *hcf136* ist die sekundäre Reduktion im Chlorophyll a-Gehalt noch nicht geklärt.

Bei der Anzucht in der Gewebekultur konnte in den Mutanten und im Wildtyp bei beiden Lichtstärken eine erhebliche Menge der Chlorophyll a-Vorstufe Chlorophyllid a gemessen werden. Die Ursache liegt vermutlich in einer verzögerten Chlorophyll-Synthese. Diese wird möglicherweise durch die geringen Lichtintensitäten (sowohl bei $2-5 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ als auch bei $50-70 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) und die damit verbundene schwächere Proteinsynthese oder durch die Anzucht auf zuckerhaltigem Medium hervorgerufen. Werden *Arabidopsis*-Keimlinge auf Erde angezogen, so ist unter gleichen Isolationsbedingungen keine nennenswerte Menge an Chlorophyllid a nachweisbar. Insofern ist es wahrscheinlich, daß das hier nachgewiesene Chlorophyllid a nicht die Folge eines vermehrten Chlorophyll a -Abbaus ist.

Die Mutanten *hcf154* und *hcf107* sind bei Anzucht unter schwachen Lichtstärken in der Chlorophyllid a-Akkumulation leicht reduziert, die übrigen Mutanten haben nahezu Wildtyp-Spiegel. Im Normallicht hat sich die Anhäufung von Chlorophyllid a bei Mutanten und Wildtyp verstärkt. Die Chlorophyllid a-Akkumulation ist in den Mutanten im Vergleich zum Wildtyp reduziert. Betrachtet man nur die Mutanten *hcf173*, *hcf154* und *hcf145*, so scheint es, als ob diese Reduktion parallel zur Reduktion der Chlorophyll a-Akkumulation stattfindet und somit eine Anpassung der Chlorophyll-Synthese an den verminderten Bedarf stattgefunden hat. Die Situation bei der Mutante *hcf136* ist dagegen eine andere: Obwohl hier der Chlorophyll a-Pegel nur 33 % des Wildtyps erreicht, liegt der Chlorophyllid a-Wert immer noch bei 74 % des Wildtyps. Die Tatsache, daß die Mutante *hcf136* in der Chlorophyllid a-Anhäufung auffällt, wird durch die Abbildung 15 noch verdeutlicht. Hierbei wurden der Chlorophyll a-Gehalt (bezogen auf 1 mg Membranprotein), das Chlorophyll a zu b-Verhältnis und das Chlorophyllid a zu Chlorophyll a-Verhältnis bei Schwach- und Normallicht in den Mutanten *hcf136*, *hcf173*, *hcf154*, *hcf145* und im Wildtyp miteinander verglichen. Die Mutanten *hcf136* und *hcf154* sind etwa gleich stark im Chlorophyll a-Gehalt reduziert. Die Mutante *hcf136* zeigt allerdings als einzige dieser vier Mutanten einen Rückgang im Chlorophyll a-Gehalt beim Vergleich beider Lichtintensitäten. Das Chlorophyll a zu b-Verhältnis ist in den drei PS II-Mutanten drastisch kleiner als im Wildtyp und in der PS I-Mutante *hcf145*. Betrachtet man nun das Chlorophyllid a zu Chlorophyll a-Verhältnis, so fällt auf, daß *hcf136* mit dem höchsten Wert bei Normallicht signifikant herausragt. Obwohl die Mutante *hcf154* in der Chlorophyll a-Akkumulation ähnlich betroffen ist, liegt das Chlorophyllid a zu Chlorophyll a-Verhältnis nahezu auf gleichem Niveau wie beim Wildtyp. Das außergewöhnlich hohe Chlorophyllid a zu Chlorophyll a-Verhältnis scheint demnach spezifisch für die Mutante *hcf136* zu sein.

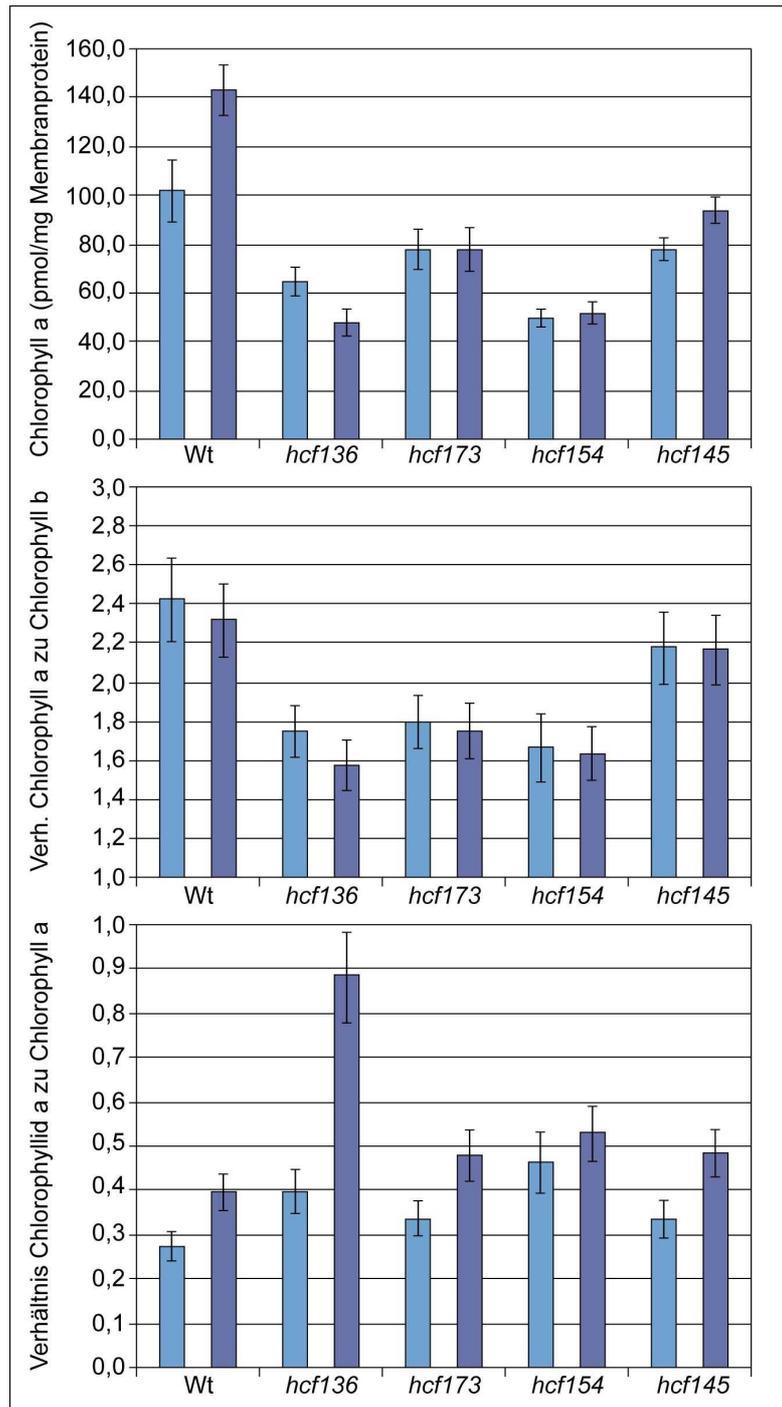


Abb. 15: Vergleich der Chlorophyll a- und Chlorophyllid a-Akkumulation in Wildtyp-Pflanzen, den PS II-Mutanten *hcf136*, *hcf173*, und *hcf154* sowie der PS I-Mutante *hcf145*. Im oberen Teil ist die Konzentration von Chlorophyll a in pmol bezogen auf 1 mg Membranprotein angegeben, in der Mitte das Chlorophyll a zu b-Verhältnis, unten das Chlorophyllid a zu Chlorophyll a-Verhältnis. Die hellblau gefärbten Balken entsprechen den Werten bei Schwachlicht, die dunkelblau gefärbten Balken den Werten bei Normallicht. Standardabweichungen sind mitberücksichtigt.

3.5.3 Das HCF136-Protein akkumuliert differentiell in den Mesophyll- und Bündelscheiden-Chloroplasten von malatbildenden C4-Pflanzen

Die Analyse der Spiegel repräsentativer Untereinheiten des PS II, des PS I und des Cytochrom b_6f -Komplexes in der Mutante *hcf136* bei Anzucht unter verschiedenen Lichtstärken hat deutlich gemacht, daß der primäre Defekt der Mutation mit dem Photosystem II verknüpft ist. Die Frage war nun, ob dieser funktionelle Zusammenhang zwischen dem HCF136-Protein und dem Photosystem II sich auch in anderen Experimenten bestätigen läßt. Aus diesem Grund wurde das Modellsystem der malatbildenden C4-Pflanzen ausgewählt, wo eine differentielle Regulation der PS II-Biogenese in den Chloroplasten der Mesophyll- und Bündelscheidenzellen vorliegt.

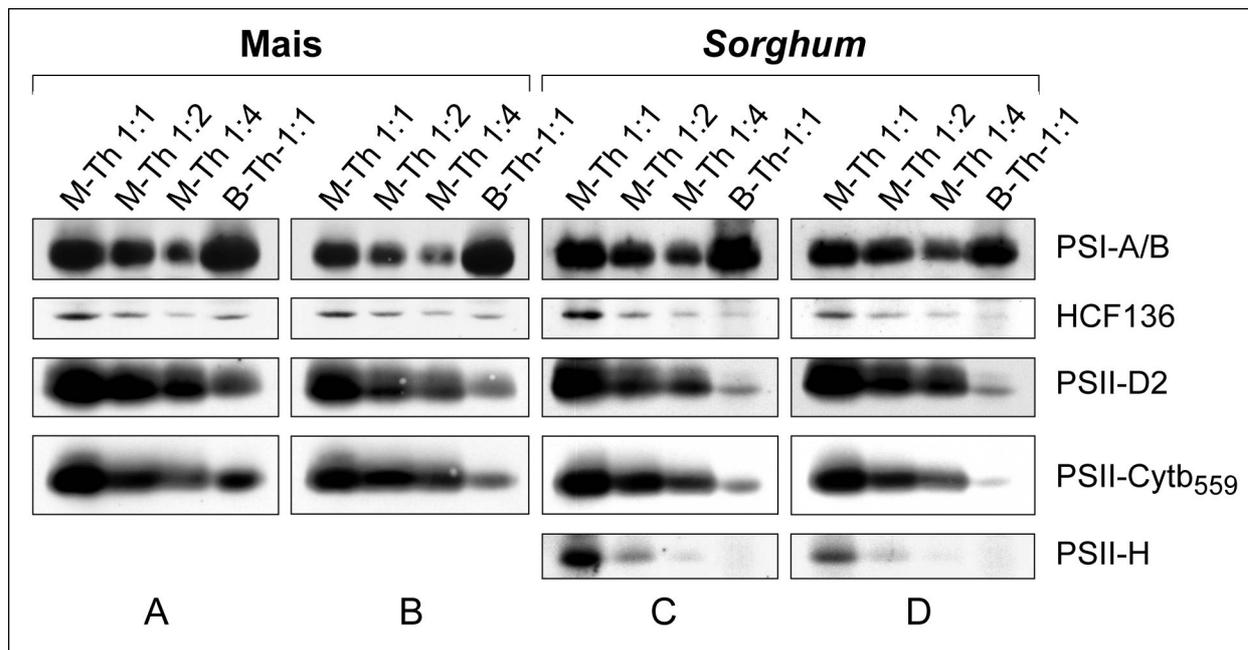


Abb. 16: Messung Proteinspiegel von PSI-A/B, HCF136, PSII-D2, PSII-Cytochrom b_{559} und PSII-H in Thylakoiden von Mesophyll- und Bündelscheidenzellen aus Mais und *Sorghum* über Immunotransferanalyse. Für Mais-Bündelscheiden-Thylakoide wurde eine Proteinmenge entsprechend 10 μg Chlorophyll (A) bzw. 50 μg Protein (B) eingesetzt. Für *Sorghum*-Bündelscheiden-Thylakoide wurde eine Proteinmenge entsprechend 5 μg Chlorophyll (C) bzw. 50 μg Protein (D) verwendet. Für die Mesophyll-Thylakoide wurde eine entsprechende Verdünnungsreihe eingesetzt.

Die Immunoblot-Analysen mit Thylakoidmembran-Präparationen aus Mesophyll- und Bündelscheidenzellen aus Mais und *Sorghum* zeigen, daß Photosystem II-Proteine in den Bündelscheiden-Chloroplasten deutlich weniger akkumulieren als in den Mesophyll-Chloroplasten (Abb. 16). Diese Reduktion ist beim Mais mit knapp unter 25% nicht so deutlich ausgeprägt wie bei *Sorghum bicolor* (deutlich unter 12.5%). Ferner ist die Reduktion für alle getesteten PS II-Untereinheiten (PSII-D2, Cytochrom b_{559} , PsbH) in Mais bzw. *Sorghum* korreliert. Eine Reduktion beim Photosystem I, angezeigt durch die Akkumulation von PSI-A/B, war nicht zu erkennen. Beim Mais konnte man eher mehr PSI-A/B in den Bündelscheiden-Chloroplasten nachweisen als in den Mesophyll-Chloroplasten. Die Immunoblot-Analyse zeigt, daß HCF136 ebenfalls präferentiell in den Mesophyll-Chloroplasten akkumuliert wird. Die verminderte Anhäufung in den Bündelscheiden-Chloroplasten von unter 50% beim Mais bzw. von deutlich weniger als 25% im Vergleich zu den Mesophyll-Chloroplasten bei *Sorghum bicolor*

korreliert allerdings nicht streng mit der bei den PS II-Untereinheiten, die jeweils stärker reduziert sind. Bei der Analyse der Proteinspiegel ist zu berücksichtigen, daß die Kreuzkontaminationen bei den Mesophyll- und Bündelscheiden-Chloroplasten bei den Zellpräparationen in einer Größenordnung von 5-10 % liegt, was durch Enzymtests (PEP-Co, Malatenzym) nachgewiesen worden ist (Meierhoff & Westhoff, 1993).

Insgesamt zeigt das HCF136-Protein in den Bündelscheiden-Chloroplasten von Mais und *Sorghum* eine verminderte Akkumulation im Vergleich zu den Mesophyll-Chloroplasten. Diese Reduktion ist bei *Sorghum* stärker ausgeprägt als bei Mais. Damit wird der funktionelle Zusammenhang von HCF136 mit dem Photosystem II durch dieses Experiment bestätigt. Allerdings ist die Reduktion der PS II-Strukturproteine in den Bündelscheiden offensichtlich noch stärker als beim HCF136-Protein. Dies kann man insbesondere beim Mais erkennen.

3.5.4 Akkumulation des HCF136-Proteins während der Ergrünung

Die Analyse der Mutante *hcf136* verdeutlichte, daß das HCF136-Protein essentiell für die Biogenese des PS II ist. Es stellte sich daher die Frage, zu welchem Zeitpunkt beim Aufbau des Photosyntheseapparates in der frühen Keimlingsentwicklung dieser Faktor synthetisiert wird. Als experimentell leicht manipulierbares System wurde die lichtinduzierte Ergrünung etiolierter Keimlinge gewählt, wobei speziell untersucht wurde, in welchen zeitlichen Zusammenhang das Erscheinen des HCF136-Proteins mit der Akkumulation der PS II-Strukturproteine steht.

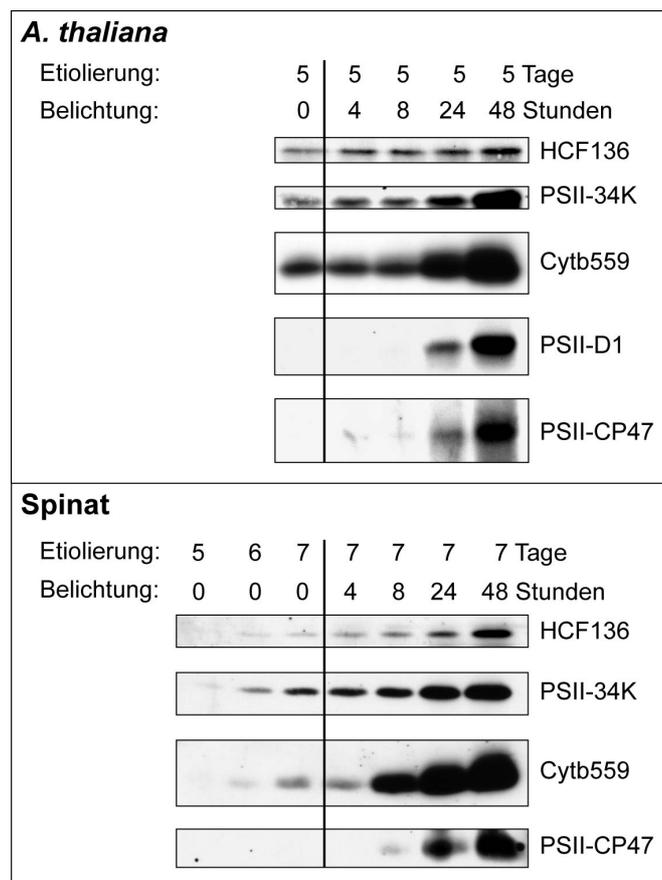


Abb. 17: Akkumulation von HCF136 und Photosystem II-Strukturproteinen in etiolierten und ergrünenden Keimlingen aus *Arabidopsis thaliana* und Spinat. Zu den angegebenen Zeitpunkten der Etiolierung bzw. der Belichtung wurden Gesamtmembranen isoliert und in einer Westernblot-Analyse mit den entsprechenden Antiseren nachgewiesen. Dazu wurden bei *Arabidopsis* jeweils 28 µg Protein und bei Spinat jeweils 20 µg Protein pro Bahn geladen.

Die Etiolierungs- und Ergrünungsexperimente mit *Arabidopsis*- und Spinat-Keimlingen zeigen, daß HCF136 schon in etiolierten Keimlingen synthetisiert wird (Abb. 17). Bei Belichtung verstärkt sich die Proteinakkumulation von HCF136, also findet hier offensichtlich auch eine lichtregulierte Genexpression statt. Damit zeigt HCF136 ein paralleles Akkumulationsverhalten zu Cytochrom b_{559} und zum kernkodierten PSII-34kD-Protein, wohingegen PSII-D1 und PSII-CP47 erst nach 8 Stunden Belichtung akkumulieren. Dies liegt daran, daß diese beiden Proteine in ihrer Proteinestabilität vom Chlorophyll a-Einbau abhängig sind (Sutton *et al.*, 1987; Westhoff *et al.*, 1990, Mullet *et al.* 1990). Die Chlorophyll-Synthese ist bei Angiospermen jedoch lichtabhängig (Porra & Meisch, 1984).

HCF136 ist also schon zum frühestmöglichen Zeitpunkt in der Entwicklung der Plastide präsent. Damit erfüllt es eine wichtige Voraussetzung für ein Protein, das als möglicher Assemblierungsfaktor des Photosystems II wirkt.

3.6 Überexpression des HCF136-Proteins in *Arabidopsis thaliana*

Der Ausfall des *HCF136*-Gens führt zu einem erheblichen Defekt in der Biogenese des Photosystems II. Daraus ergab sich die Frage, welche Auswirkungen auf der anderen Seite eine Überexpression des Faktors in *Arabidopsis thaliana* herbeiführt. Zu diesem Zweck sollten zunächst Überexpressionslinien hergestellt werden.

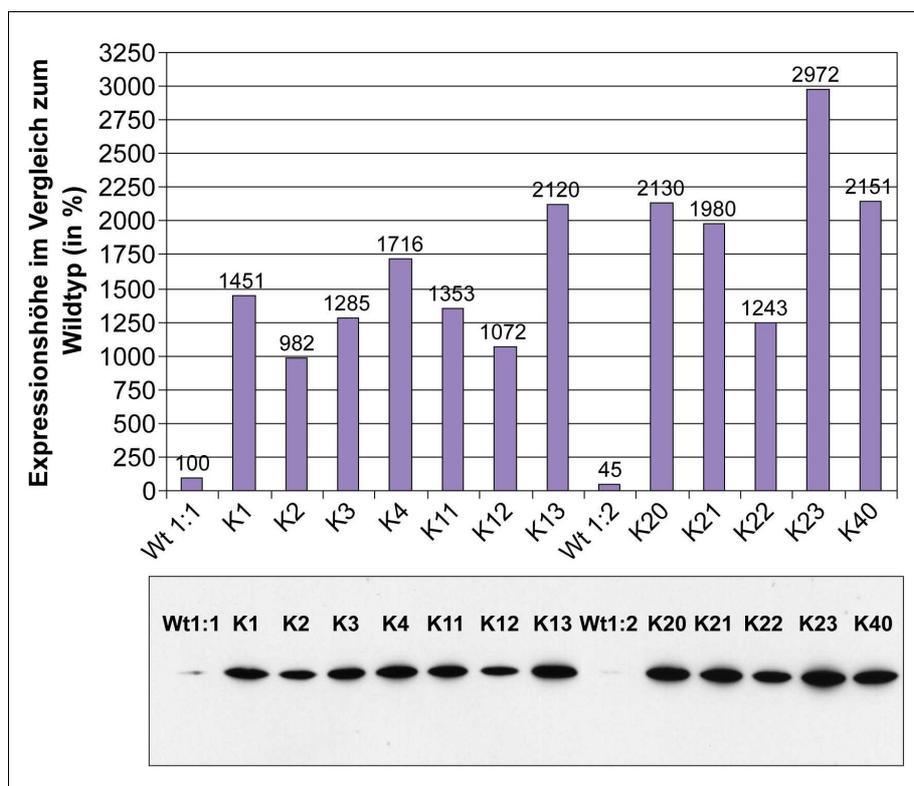


Abb. 18: Überexpression von HCF136 in komplementierten Linien von *Arabidopsis thaliana*. Aus drei Wochen alten Pflanzen wurden Gesamtproteine isoliert und in einer Immunoblot-Analyse mit HCF136-Antiserum untersucht. Es wurde jeweils eine Proteinmenge entsprechend 1 µg Chlorophyll (beim Wildtyp zusätzlich 1 x 0.5 µg) pro Bahn aufgetrennt. Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe des Lumineszenz-Imagingsystems (Fujifilm Co., Düsseldorf) und dem Auswerteprogramm Image Gauge 3.0. Unten ist der entsprechende Röntgenfilmausschnitt abgebildet.

Um dies zu erreichen, wurde für die Komplementation der Mutante (s. 3.1) die HCF136-cDNA in den Pflanzenexpressionsvektor pPCV91 (Strizhov *et al.*, 1996) kloniert und damit unter die Kontrolle des konstitutiven 35S-Promotors gestellt. Dies sollte hohe Expressionsraten des Transgens gewährleisten.

Die komplementierten Linien wurden zur Selbstung gebracht und es wurden Nachkommen ausgewählt, die für die neu transformierte T-DNA mit der HCF136-cDNA homozygot sind. Diese Linien wurden auf Erde angezogen. Aus 3 Wochen alten Pflanzen wurden Gesamtproteine isoliert, um in einer Immunoblot-Analyse die Spiegel an HCF136-Protein zu messen. Zum Vergleich wurden Wildtyp-Keimlinge unter gleichen Bedingungen angezogen und entsprechende Proteinextrakte hergestellt. Abb. 18 zeigt sehr deutlich, daß die Komplementationslinien das HCF136-Protein 10-20fach stärker akkumulieren als der Wildtyp, bei der Linie K23 sogar fast 30fach höher. Aus den ehemaligen Mutanten sind somit durch Komplementation HCF136-Überexpressionslinien geschaffen worden.

3.6.1 Lichtstreß-Experimente an HCF136-Überexpressionslinien von *Arabidopsis thaliana*

Aufgrund des Phänotyps der Mutante *hcf136* konnte die Vermutung abgeleitet werden, daß das HCF136-Protein essentiell für die Stabilität oder Assemblierung des Photosystems II ist. Es war daher naheliegend, zu untersuchen, inwieweit eine HCF136-Überexpression eine höhere Toleranz des Photosystems II gegenüber Lichtstreß gewährt. Die Überexpressionslinien sollten daher in Lichtstreß-Experimenten mit dem Wildtyp verglichen werden. Ein Unterschied in Bezug auf Lichtstreßtoleranz könnte nähere Informationen über die Funktion dieses Hilfsfaktors geben. Die Mutante *hcf136* von *Arabidopsis thaliana* stammte ursprünglich aus einer T-DNA-Kollektion des Ökotypen *Wassilewskija*, ist dann aber zur T-DNA-Vereinzelung mit Pflanzen des Ökotypen *Columbia* rückgekreuzt worden (Meurer, 1996). Insofern enthalten die Überexpressionslinien, die durch Komplementation aus den Mutanten hervorgegangen sind, keinen „genetisch reinen“ Hintergrund, sondern stellen Misch-Ökotypen dar. Dies bedeutet, daß die einzelnen Linien sich in bestimmten Eigenschaften deutlich voneinander unterscheiden können, was bei den Lichtstreßmessungen berücksichtigt werden mußte. So wurden stets Wildtyp-Pflanzen der beiden Ökotypen *Wassilewskija* und *Columbia* zur Kontrolle mitgemessen, bei einigen Experimenten wurde der Ökotyp *Landsberg erecta* noch zusätzlich gemessen. Als Maß für die Lichtstreßtoleranz wurde die Chlorophyll-Fluoreszenz herangezogen (Baker & Horton, 1987; Vavilin *et al.*, 1998).

Es wurden drei verschiedene Experimente zur Messung der Fluoreszenzparameter durchgeführt: Zunächst wurden ganze Pflanzen im Alter von 10 Tagen auf Erde bei Raumtemperatur gemessen (siehe Methodenteil 2.4.1.2). Bei einem aktinischem Licht von $1.200 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ und regelmäßigen sättigenden Lichtpulsen (auch während der Erholungsphase) konnten die variable Fluoreszenz zu Beginn, während des Lichtstresses und in der Erholung verfolgt werden. Ferner wurden photochemische und nicht-photochemische Löschung der Chlorophyll-Fluoreszenz bei den einzelnen Linien verfolgt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 zusammengefaßt. Man erkennt, daß die Überexpressionslinien sich in allen berechneten Parametern nicht wesentlich von den Wildtyp-Pflanzen unterscheiden. Die nicht-photochemische Löschung durch Photoinhibition (qI) ist ein Maß dafür, wie sehr das Photosystem II durch Lichtschädigung indirekt die Fluoreszenz löscht (Baker & Horton, 1987).

Der Anteil von q_l an der Gesamtlöschung beträgt immerhin 12-22 % und ist damit recht hoch. Dies ist ein deutlicher Hinweis, daß die Lichtintensität von $1.200 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ausreicht, um eine Lichtschädigung zu induzieren. Je kleiner der Wert von q_l ist, um so mehr wird das PS II vor Lichtschädigung geschützt. Hier zeigen die Überexpressionslinien jedoch eher die Tendenz zu höheren q_l -Werten.

Linie	F_v/F_m	F_{vs}/F_{ms}	F_v'/F_m'	$\Phi(\text{PSII})$	qP/q_{ges}	qN/q_{ges}	qE/q_{ges}	q_l/q_{ges}
Wt Was	0,80	0,42	0,73	0,05	5,6%	94,4%	82,2%	12,2%
Wt Col	0,81	0,44	0,73	0,06	6,3%	93,7%	77,4%	16,3%
Wt Ler	0,77	0,41	0,67	0,05	8,1%	91,9%	77,3%	14,6%
K1-2	0,81	0,43	0,72	0,06	5,1%	94,9%	77,0%	17,9%
K3-1	0,82	0,44	0,74	0,07	6,3%	93,7%	78,4%	15,2%
K4-1	0,80	0,45	0,72	0,09	13,3%	86,7%	72,3%	14,5%
K11-5	0,82	0,44	0,70	0,06	6,1%	93,9%	77,3%	16,6%
K13-1	0,80	0,44	0,71	0,09	9,5%	90,5%	70,5%	20,0%
K21-1	0,81	0,45	0,72	0,06	6,5%	93,5%	74,9%	18,6%
K23-4	0,83	0,52	0,70	0,07	6,2%	93,8%	71,7%	22,1%
K40-4	0,82	0,42	0,71	0,09	9,8%	90,2%	68,0%	22,2%
K50-6	0,75	0,37	0,68	0,08	13,9%	86,1%	73,0%	13,1%

Tab. 6: Untersuchung von Chlorophyllfluoreszenz-Parametern an Wildtyp-Pflanzen und HCF136-Überexpressionslinien. Es wurden 10 Tage alte Einzelpflanzen bei einem aktinischen Licht von $1.200 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ und regelmäßigen sättigenden Lichtpulsen bei Raumtemperatur gemessen. F_v ... variable Fluoreszenz, F_m ... maximale Fluoreszenz (zu Beginn, im stationären Zustand und in der Erholungsphase), $\Phi(\text{PSII})$... Quantenausbeute des Photosystems II, qP photochemische Löschung, qE ... energieabhängige Löschung, q_l Löschung durch Photoinhibition

In einem zweiten experimentellen Ansatz wurden die Lichtstreßbedingungen drastisch verstärkt: 10 Tage alte Keimlinge wurden 100 min lang bei 4°C und $2.000 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ gestreßt und während dieser Phase bzw. während einer Erholungsphase bei Raumtemperatur und $50 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ wurde die Chlorophyll-Fluoreszenz-Induktion an Blattstücken gemessen (s. Abb. 19). Dabei verstärkten die kalten Temperaturen beim Lichtstreß die photoinhibitorischen Bedingungen. Bei Kälte wird die eingefangene Lichtenergie in geringerem Maße durch Photosynthese (photochemische Löschung) bzw. Wärmedissipation (nicht-photochemische Löschung) verarbeitet und führt so zur erhöhten Lichtschädigung am Photosystem II (Baker & Horton, 1987).

Aus den 13 Überexpressionslinien wurden für diese Messungen nur drei Linien ausgewählt und zur statistischen Absicherung wurden Mehrfachmessungen durchgeführt. Als Maß für die Lichtstreßtolerierung wurde das F_v/F_m -Verhältnis verfolgt. Abb. 19 zeigt, daß unter den gewählten Bedingungen das Photosystem II nachhaltig geschädigt wird: Das F_v/F_m -Verhältnis geht bei den Keimlingen auf bis zu 0,35 herunter und erreicht auch noch nach 3 Stunden Erholungsphase nicht das Ursprungsniveau. Berücksichtigt man die hohen Schwankungen der Werte einer Linie unter solchen Extrembedingungen (indiziert durch die Standardabweichung), so kann man zwischen Wildtyp- und Überexpressionslinien keinen Unterschied in der Streßtoleranz feststellen. Auch in der Erholungsphase können die Überexprimierer einen voll funktionsfähigen PS II-Pool nicht schneller aufbauen als der Wildtyp.

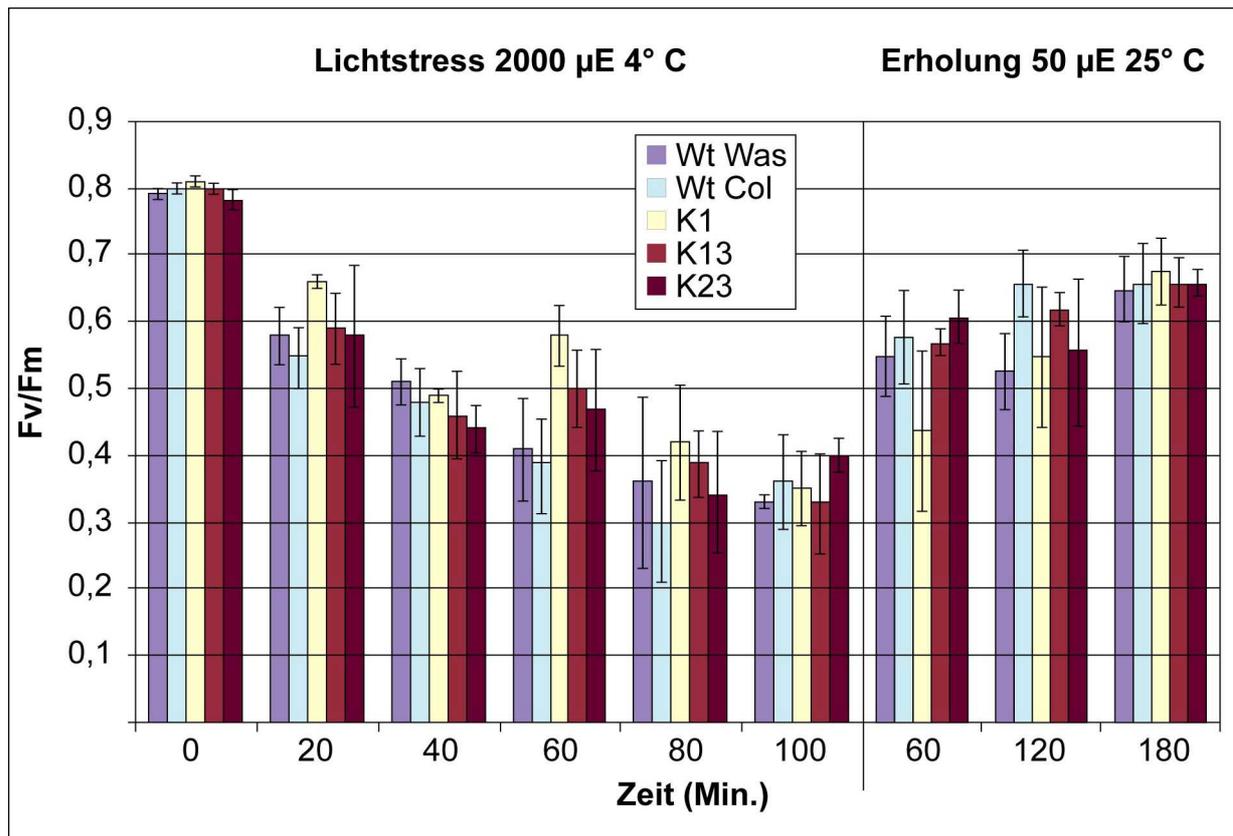


Abb. 19: Chlorophyll-Fluoreszenz-Induktionsmessungen von 10 Tage Wildtyp- und HCF136-Überexpressionskeimlingen von *Arabidopsis thaliana* während und nach einer Lichtstreßphase von 2000 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ und 4° C. Als Maß für die Streßtoleranz wurde das Verhältnis F_v/F_m verfolgt.

In einem dritten experimentellen Ansatz wurden 10 Tage alte Keimlinge 30 min bei 4° C und 2.000 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ gestreßt. Diesmal wurden Gesamtmessungen von je ca. 10 Keimlingen auf Erde in einer Petrischale mit Hilfe des FluorCam-Systems durchgeführt (Lichtenthaler & Miehe, 1997; siehe Methodenteil 2.4.2). Dies hatte den Vorteil, statistisch abgesicherte Durchschnittswerte zu jeder Linie bestimmen zu können. Leider konnte das seinerzeit verwendete System keine realen F_m -Werte messen, da die Lichtintensität des sättigenden Lichts mit 350 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ dazu nicht ausreichte. In einer 5 s - Kurzmessung wurde dennoch ein „ F_v/F_m “-Verhältnis berechnet und die Werte unmittelbar nach der Lichtstreßphase bzw. in der Erholungsphase mit Kontrollwerten, die vor dem Lichtstreß gemessen worden sind, in Relation gesetzt (Abb. 20 oben). Man erkennt, daß die Überexpressionslinien keinen prinzipiellen Unterschied zu den Wildtyp-Linien in der Chlorophyll-Fluoreszenz-Induktion zeigen.

Um ein Maß für die Fähigkeit zur Fluoreszenzlöschung zu erhalten, wurden vor und unmittelbar nach einer Lichtstreßphase sowie in der Erholungsphase Langzeitmessungen von 5 min bei 160 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ aktinischem Licht durchgeführt. Die stationäre Fluoreszenz nach 150 Sek. Meßdauer wurde zur Anfangsfluoreszenz in Relation gesetzt (Abb. 20 unten). Auch in der Fluoreszenzlöschung kann man keinen prinzipiellen Unterschied zwischen Wildtyp- und Überexpressionslinien erkennen.

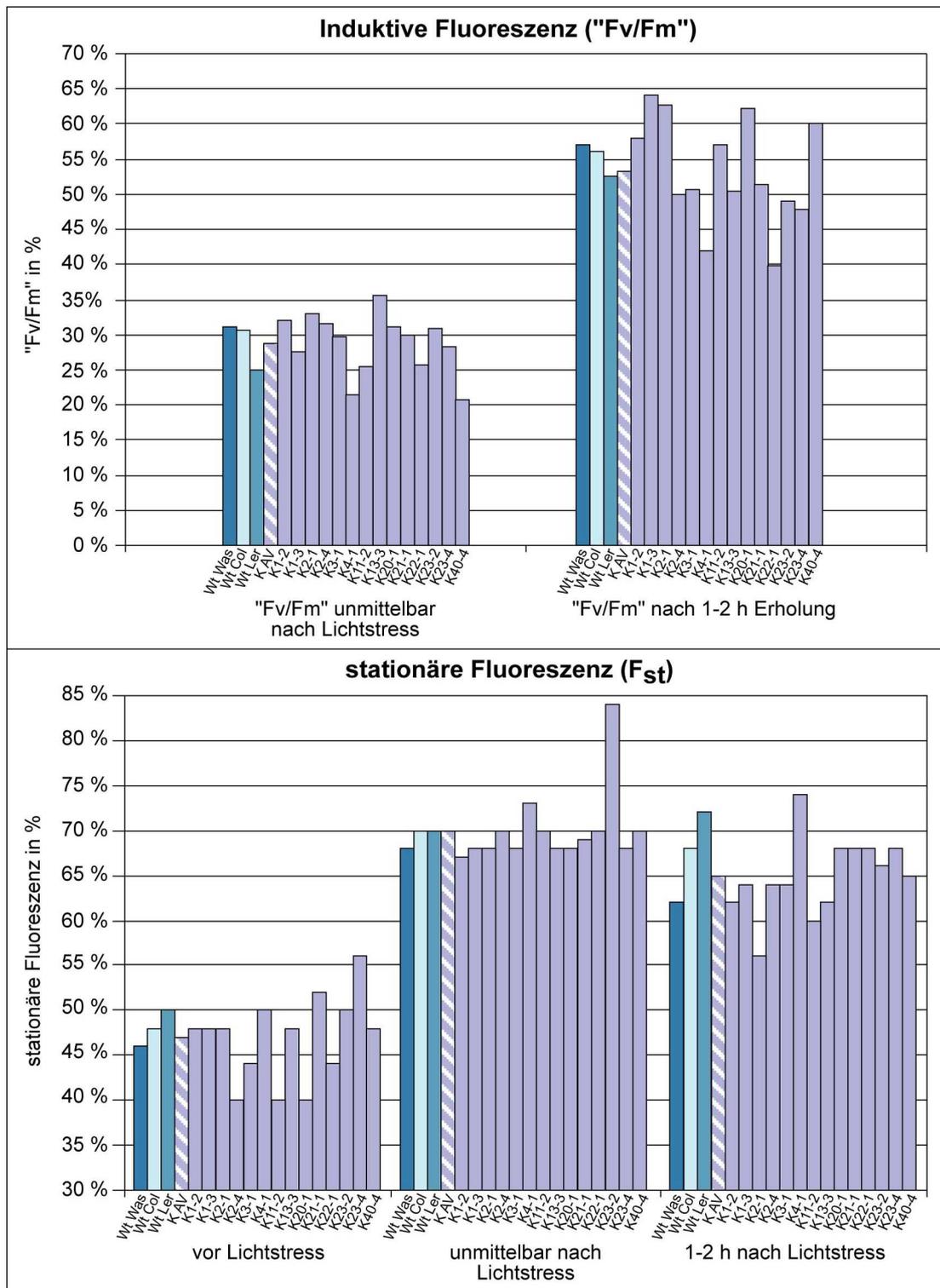
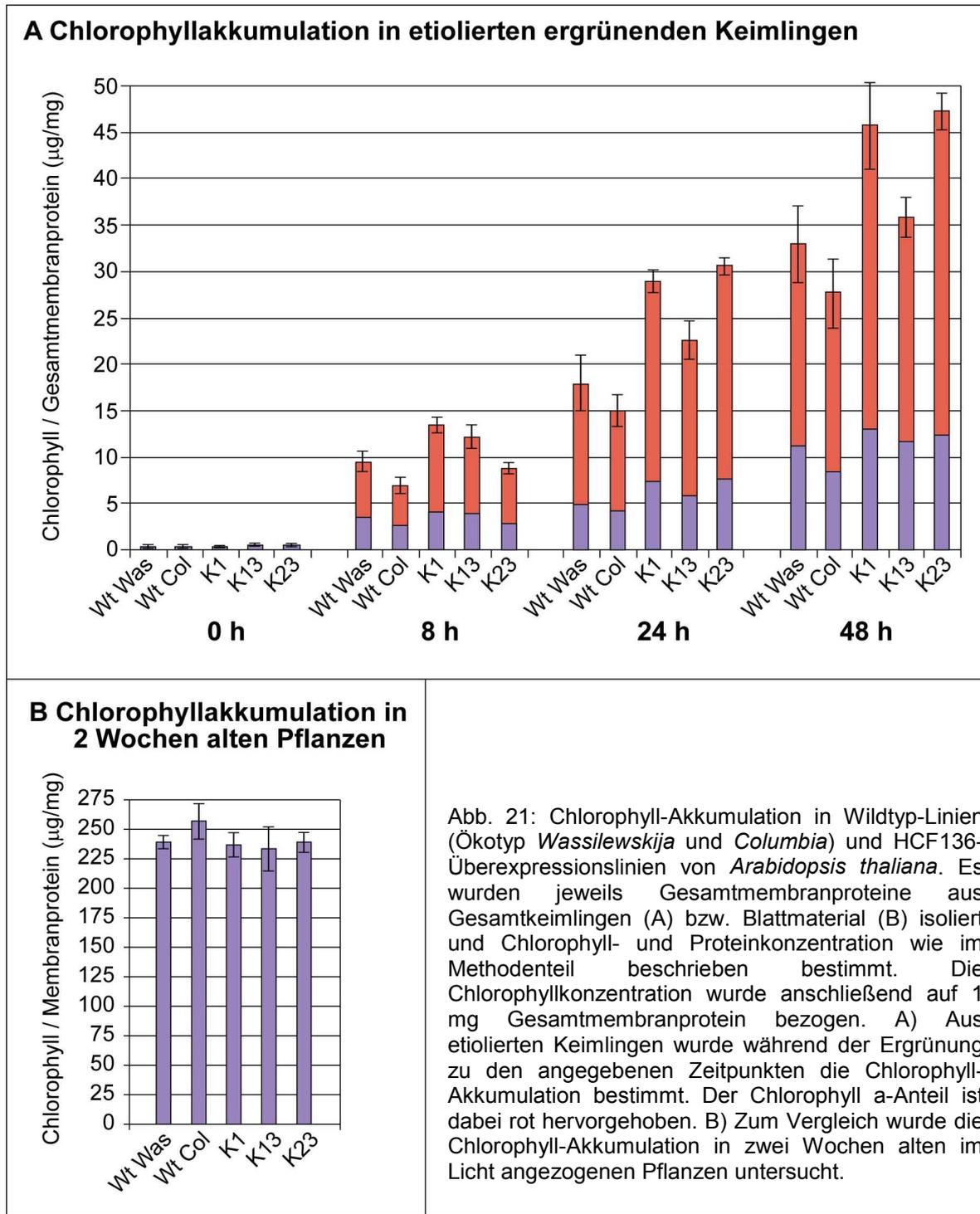


Abb. 20: Fluoreszenz-Induktionsmessungen mit dem FluorCam-System. Durchschnittlich je 10 Keimlinge (10 Tage alt) wurden auf gut gewässerte Erde in Petrischalen 15 min im Kaltraum belassen und dann 30 min lang mit $2.000 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ und 4°C gestreßt. Anschließend wurde die Chlorophyll-Fluoreszenz mit dem FluorCam-System gemessen. Berechnet wurden jeweils die Durchschnittswerte aller Keimlinge pro Petrischale. Oben: Kurzmessung von 5 Sekunden zur Bestimmung des F_v/F_m -Verhältnisses (induktive Fluoreszenz). Da das verwendete FluorCam-System keine sättigende Lichtintensität lieferte, werden keine realen F_m -Werte erreicht. Es werden daher die F_v/F_m -Verhältnisse relativ zu den jeweiligen Werten vor dem Lichtstreß bei den einzelnen Linien miteinander verglichen (in %). Unten: Nach 150 Sek. aktinischem Licht wurde die Fluoreszenz der einzelnen Linien relativ zum Niveau zu Beginn der Messung aufgetragen (F_{max} zu Beginn = 100%).

3.6.2 Untersuchungen zur Chlorophyll-Akkumulation in HCF136-Überexpressionslinien während der Ergrünungsphase etiolierter *Arabidopsis*-Keimlinge

Aufgrund des deutlich reduzierten Chlorophyll a-Gehalts und des erhöhten Chlorophyllid a zu Chlorophyll a-Verhältnisses in der Mutante *hcf136* (s. 3.5.2) stellte sich die Frage, welche Auswirkungen eine HCF136-Überexpression auf die Chlorophyll-Akkumulation von *Arabidopsis*-Keimlingen hat.



Dazu wurden Wildtyp-Keimlinge der Ökotypen *Wassilewskija* und *Columbia* sowie Keimlinge der drei Überexpressionslinien K1, K13 und K23 von *Arabidopsis thaliana* ausgewählt. Voruntersuchungen zeigten, daß in zwei Wochen alten Keimlingen zwischen Wildtyp und HCF136-Überexprimierern kein Unterschied in der Höhe der Chlorophyll-Akkumulation zu erkennen ist (Abb. 21B). Daher wurden die folgenden Untersuchungen an etiolierten *Arabidopsis*-Keimlingen während der anschließenden Ergrünungsphase durchgeführt (Abb. 21A). Da die Überexpressionslinien das HCF136-Protein konstitutiv exprimieren, weisen sie schon im Dunkeln wesentlich höhere HCF136-Spiegel als der Wildtyp auf. In der Ergrünungsphase sollte daher ein Unterschied zwischen Wildtyp- und Überexpressionslinien in der Chlorophyllakkumulation am ehesten zu sehen sein.

Abb. 10A zeigt die Chlorophyll-Akkumulation bezogen auf 1 mg Gesamtmembranprotein in den ersten 48 h der Ergrünung etiolierter Keimlinge. Man erkennt, daß der Wildtyp *Columbia* langsamer in der Chlorophyll-Akkumulation ist als der Wildtyp *Wassilewskija*. Von den drei Überexpressionslinien zeigen zwei Linien (K1 und K23) zu den Zeitpunkten von 24 h und 48 h der Ergrünung eine signifikant höhere Chlorophyll-Akkumulation als der „schnellere“ Wildtyp *Wassilewskija*. Die Linie K13 zeigt zumindest die Tendenz zu einer höheren Chlorophyll-Akkumulation als der Wildtyp, allerdings ist dies nicht statistisch signifikant. Der Unterschied zwischen den Wildtyp-Linien und den Linien K1 und K23 ist zum Zeitpunkt 24 h nach Beginn der Belichtung offenbar am höchsten, während nach 48 h die Wildtyp-Linien in der Chlorophyll-Akkumulation „aufholen“. Dennoch erreichen sie hier erst das Niveau, das die Linien K1 und K23 schon nach 24 h erreicht hatten. Interessanterweise ist die höhere Chlorophyll-Akkumulation in erster Linie auf eine höhere Chlorophyll a-Anhäufung zurückzuführen, der Unterschied zwischen Wildtyp und Überexprimierern in der Chlorophyll b-Akkumulation ist gering.

In Abb. 22A und B kann man erkennen, daß die Überexpressionslinien nach 30 h Ergrünung doppelt bis dreimal so große Blattflächen aufweisen wie die beiden Ökotypen des Wildtyps. Dabei zeigt sich in den Hypokotyllängen kein wesentlicher Unterschied zwischen Wildtyp und Überexpressionslinien. Allerdings sind auch die Wurzeln bereits ca. zweimal so lang wie bei den Wildtyp-Linien. Insgesamt scheinen die Überexpressionslinien in der Lage zu sein, sich schneller an die Belichtung anpassen zu können.

Um herauszufinden, welche chlorophyllbindenden Proteine für die höhere Chlorophyll a-Akkumulation verantwortlich sind, wurden aus den Keimlingen nach 24 h Belichtung Gesamtmembranen isoliert und die Proteinspiegel repräsentativer Untereinheiten der beiden Photosysteme, des Lichtsammelkomplexes II sowie von PetD über Immunoblot-Analysen gemessen (Abb. 23). Dabei wurden zum einen gleiche Proteinmengen und zum anderen gleiche Chlorophyllmengen der einzelnen Linien für die Western-Analyse eingesetzt. Man kann deutlich sehen, daß unabhängig von der Normierung in den Überexpressionslinien erheblich mehr HCF136 akkumuliert wurde als in den beiden Ökotypen des Wildtyps. Ferner wird deutlich, daß beim Wildtyp *Columbia* bei Normierung nach gleicher Proteinmenge die Proteinspiegel der einzelnen Untereinheiten stets niedriger sind als beim *Wassilewskija*-Ökotyp bzw. bei den Überexpressionslinien. Bei der Normierung nach gleichen Proteinmengen sieht man bei allen drei Überexpressionslinien mehr PS II-D2 und PS II-CP47 als in den beiden Wildtyp-Ökotypen. Die Spiegel von PS II-D1 und PS II-CP43 liegen nur bei der Linie K23 höher als beim Wildtyp *Wassilewskija*.

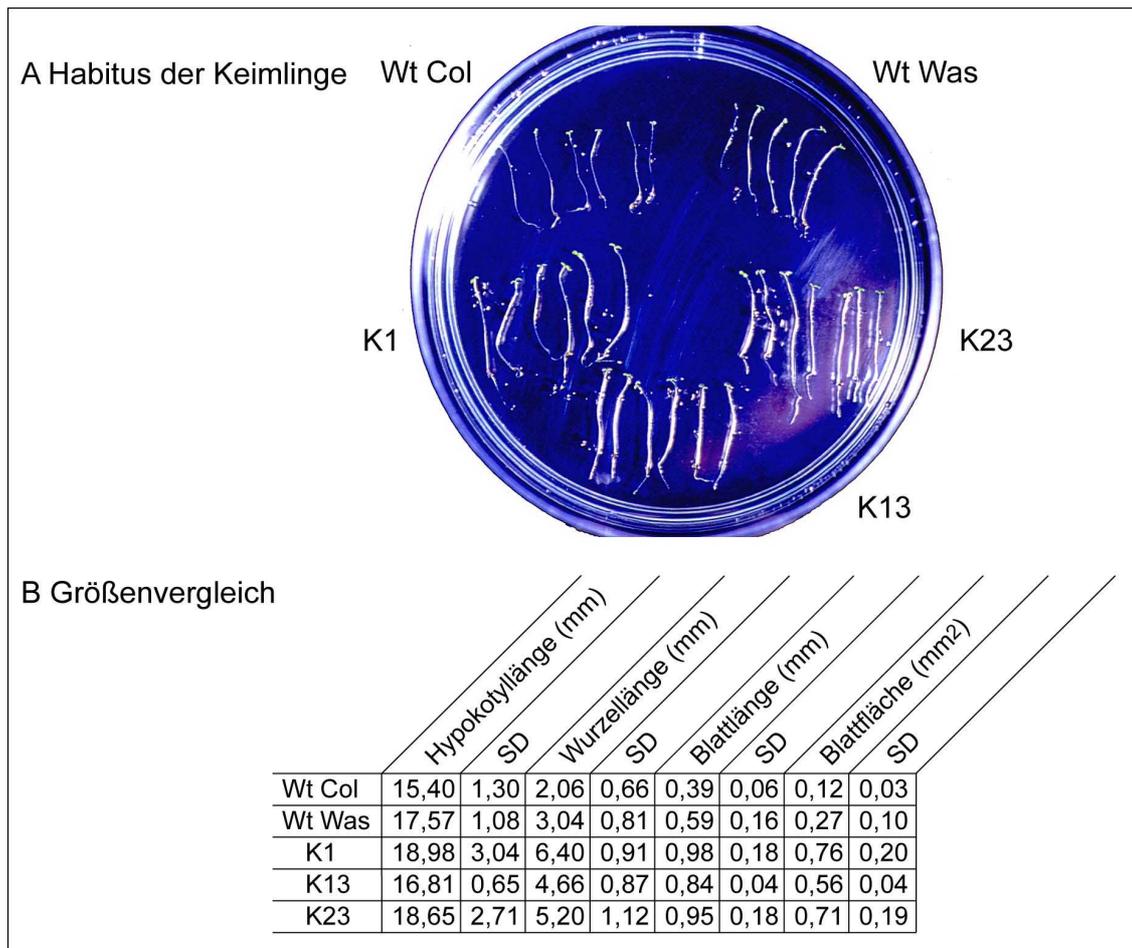


Abb. 22: Vergleich der ergrünten etiolierten Keimlinge der Wildtyp-Ökotypen *Wassilewskija* und *Columbia* und der Überexpressionslinien K1, K13 und K23. A) Habitus nach 30 Stunden Ergrünung. B) Größenvergleich in A dargestellten Keimlinge.

Hier fällt aber auf, daß beim Wildtyp *Wassilewskija* eine höhermolekulare Form von CP43 stärker akkumuliert. Beim D1-Protein erkennt man ebenfalls, daß bei beiden Wildtyp-Ökotypen ausschließlich eine höhermolekulare Form des D1-Proteins vorliegt, bei der es sich möglicherweise um die unprozessierte Form pD1 handelt. Bei Cytochrom b_{559} , PetD und LHC II liegen in den drei K-Linien und im Wildtyp *Wassilewskija* in etwa gleiche Proteinspiegel vor. Interessanterweise zeigen die K-Linien geringere oder wie bei K23 gleich hohe PSI-A/B Spiegel im Vergleich zum *Wassilewskija*-Wildtyp. Bei Normierung nach Chlorophyll sind die Unterschiede zwischen den Linien in der Proteinakkumulation weitgehend ausgeglichen. Eine Ausnahme bildet die Überexpressionslinie K23, die mehr D1, D2, CP43 und CP47 aufweist als die übrigen K-Linien bzw. der Wildtyp. Diese Linie hatte auch die stärkste Chlorophyll-Akkumulation. Dennoch zeigt sie deutlich geringere PSI-A/B-Spiegel als der Wildtyp *Wassilewskija*. Zusammengefaßt lassen sich folgende Rückschlüsse ziehen: Die erhöhte Chlorophyll-Akkumulation ist nicht auf den erhöhten Pegel einer bestimmten Untereinheit zurückzuführen. Insgesamt haben die Überexpressionslinien aber die Tendenz zu einer höheren PS II-Akkumulation, die möglicherweise auf Kosten einer geringeren PS I-Akkumulation geht. In den Wildtyp-Ökotypen häuft sich die Vorstufen-Form des D1-Proteins verstärkt an, wohingegen die Prozessierung bei den Überexpressionslinien schon vollständig stattgefunden hat.

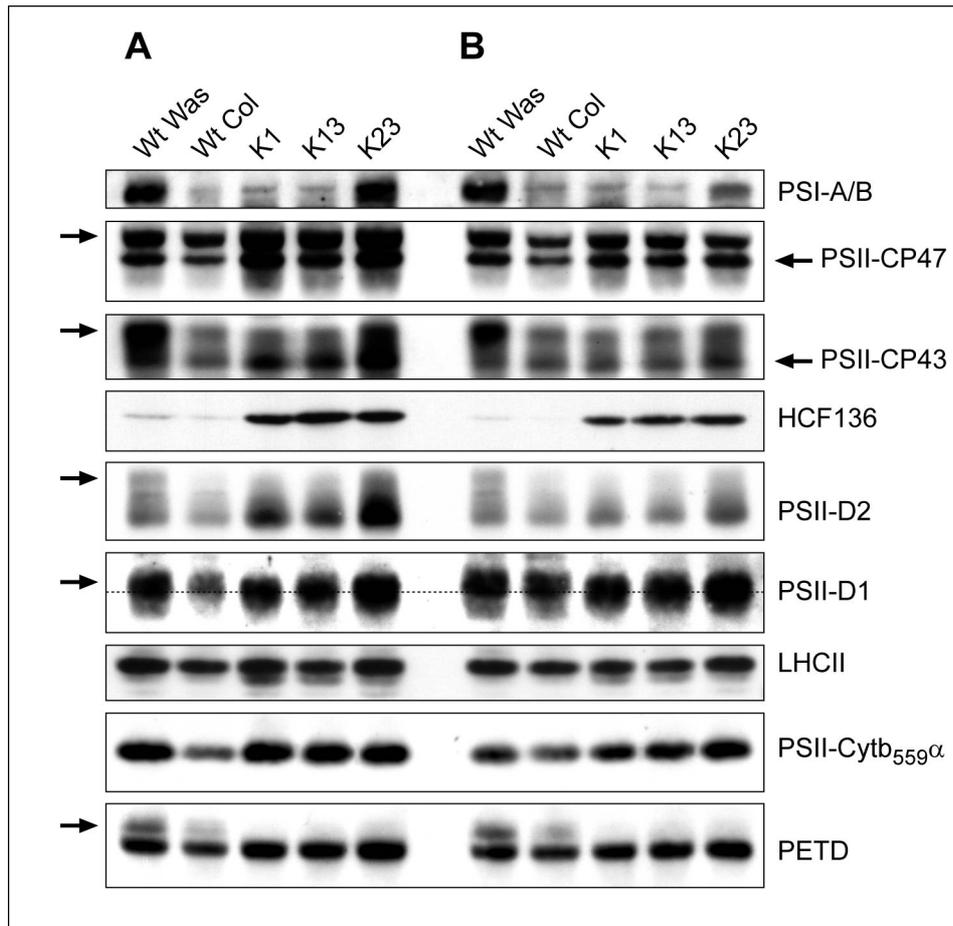


Abb. 23: Immunoblot-Analyse von Gesamtmembranproteinen aus etiolierten *Arabidopsis*-Keimlingen (Wildtyp- und Überexpressionslinien) nach 24 Stunden Belichtung. Für den Westernblot wurden 10 µg Membranprotein (A) bzw. 0.15 µg Chlorophyll (B) gelelektrophoretisch aufgetrennt. Zur Messung der Proteinakkumulation wurden Antikörper gegen Untereinheiten des PS II-Kernkomplexes, gegen PSI-A/B, LHC II, Cytochrom b559 und PetD eingesetzt.

3.7 Suche nach Interaktoren des HCF136-Proteins

Die Suche nach Interaktionspartnern des HCF136-Proteins stand unter dem Gesichtspunkt, anhand solcher Interaktoren weitere Informationen über die mögliche Funktion des Faktors bei der Biogenese des Photosystems II zu erhalten. Zu diesem Zweck wurde sowohl ein molekularbiologischer als auch ein biochemischer Ansatz ausgewählt.

3.7.1 Das Hefe-Zwei-Hybrid-System

Das Hefe-Zwei-Hybrid-System gehört mittlerweile zu den Standardmethoden, um auf molekularbiologischem Wege Interaktionen zwischen zwei Proteinen nachzuweisen (Brent & Finley, 1997; Fromont-Racine *et al.*, 1997; Lecrenier *et al.*, 1998 Uetz & Hughes, 2000). Dank der Kreuzungstechnik unterschiedlich ausgestatteter Hefestämme ist es inzwischen einfacher geworden, ganze Banken auf Interaktion zu einem bestimmten Köderprotein hin zu sichten. Da das HCF136-Protein ein prinzipiell löslicher Faktor ist, dessen Expression in der Hefe problemlos verlaufen sollte, wurde diese Methode zur Identifikation von Interaktionspartnern eingesetzt.

Zunächst wurde eine cDNA-Bank von *Arabidopsis thaliana* mit HCF136 als Köderprotein (komplettes Protein ohne Transitsequenz) gesichtet. Das Ergebnis ist in Abb. 24 zusammengefaßt.

Beute-136-5p

TPKGMQPTSVGSSGGDDGGRRGGGGLSRSGLSRIRSAPATWLEALLEEDEEES
 LKPNLGLTDLTGNNDLPTSRGSFEFPIPVEQGLYQGGFHRQNSTPADFLSGS
 DGFIQSFGIQANYDYLSGNIDVFPGSKRSREMEALFSSPEFTSQMKGEQSSGQVP
 TGVSSMSDMNENLMEDSVAFRVRAKRGKATHPRSAERVRTRISDRIRKLQEL
 VPNMDKQTN**TADMLEEAVEYVKVLQRQIQELTE**VDAANSRSM . . .

Beute-136-4p

TQELVPNMDKQTN**TADMLEEAVEYVKALQSQIQELTE**QQKRCKCKPKEEQ.
 (es folgt nicht translaterter Bereich)

Beute-136-13p

TADMLEEAVEYVKALQSQIQELTEQQKRCKCKPKEEQ.
 (es folgt nicht translaterter Bereich)

schwarz: Vektorsequenzen
 rot: gemeinsames Motiv
 grün: Zusatzsequenzen vor Motiv
 blau: Zusatzsequenzen nach Motiv

höchster Treffer in BLAST-Suchen:

"Helix-Loop-Helix protein" (*Arabidopsis thaliana*)
 Accession CAB78042

Beute-136-1p (Aminoterminus)

TNDLPSELVEATTFLSDAEVKCLKGLGGTN.

höchster Treffer in BLAST-Suchen:

"Germin-like protein" (*Arabidopsis thaliana*)
 Accession AAB51571

Abb. 24: Ergebnis der Sichtung einer *Arabidopsis thaliana* cDNA-Bank im Hefe-Zwei-Hybrid-System. Es wurden vier verschiedene Klone gefunden; drei scheinen Fragmente desselben Gens zu sein (durch Farben hervorgehoben). Dadurch ergibt sich ein gemeinsamer, überlappender Konsensusbereich, der für die Interaktion mit HCF136 notwendig ist.

Die Sichtung von 2.1×10^7 Hefeklonen entsprechend 3.0×10^6 cDNA-Klonen lieferte zunächst 44 positive Klone, die sich über PCR in vier Gruppen (= Ursprungsklone) zuordnen ließen. Die Plasmid-DNA aus diesen vier Klonen wurde zunächst für Eigenaktivierungstests verwendet. Keiner der vier Klone war alleine in der Lage, den Hefezellen das Wachstum auf Selektionsmedien zu ermöglichen. Nur bei Ko-Expression von HCF136 war ein Wachstum möglich. Insofern muß tatsächlich eine Interaktion zwischen HCF136 und dem jeweiligen Klon stattgefunden haben. Als nächstes wurde die DNA der isolierten Klone sequenziert, und die erhaltenen DNA-Sequenzen in Aminosäuresequenzen übersetzt. Drei Klone scheinen Fragmente desselben Gens zu sein (Abb.24: Beute 136-5p, -4p und -13p). Der überlappende Bereich der drei Klone ist offenbar essentiell für die Interaktion mit HCF136.

In BLAST-Suchen wurde mit diesem Bereich ein "Helix-Loop-Helix"-Protein von *Arabidopsis thaliana* identifiziert (Accession CAB78042). Die Gruppe der Helix-Loop-Helix-Proteine umfaßt Familien von Proteinen, die vermutlich alle als Transkriptionsfaktoren im Kerngenom wirken. Auch das hier identifizierte Gen ist vermutlich im Kern lokalisiert, es läßt sich jedenfalls keine Plastiden-Transitsequenz am Aminoterminal erkennen. Damit handelt es sich um ein mit HCF136 interagierendes Protein, bei der die Interaktion aufgrund der verschiedenen Wirkorte in der Zelle – HCF136 im Thylakoidlumen und das detektierte Protein im Kern - keinen biologischen Sinn macht. Helix-Loop-Helix-Proteine bestehen aus zwei α -Helices, die durch eine Schleife voneinander getrennt werden sowie einer basischen Region (Robinson & Lopes, 2000). Letztere ist für die Interaktion mit Ziel-DNA-Sequenzen erforderlich, während das Helix-Loop-Helix-Motiv für die Interaktion mit einem zweiten Helix-Loop-Helix-Protein zur Bildung von Dimeren zuständig ist. Interessanterweise ist gerade der Konsensbereich der drei Klone Teil dieses Helix-Loop-Helix-Motivs, wie Untersuchungen mit der Proteinmotivdatenbank „Prosite“ ergaben. HCF136 zeigt also Interaktion mit α -helikalen Domänen.

Der vierte Klon, der durch das Sichten der cDNA-Bank gesichtet wurde, konnte als „Germin-like protein“ von *Arabidopsis thaliana* identifiziert werden. Auch hier handelt es sich vermutlich um einen Transkriptionsfaktor, dessen Interaktion mit HCF136 keinen biologischen Sinn macht.

In einem zweiten Ansatz sollte eine Plastidenbank zur Sichtung im Hefe-Zwei-Hybrid-System eingesetzt werden. Die möglichen Interaktionspartner von HCF136, nämlich Komponenten des PS II-Kernkomplexes, sind integrale Membranproteine, die als ganze Proteine nicht in der Hefe erfolgreich exprimiert bzw. in den Kern transportiert werden können. Bei möglichst kleinen ptDNA-Fragmenten ist die Wahrscheinlichkeit am größten, DNA-Sequenzen für weitgehend hydrophile Proteinabschnitte im Leseraster zu klonieren. Diese können dann z.B. die luminalen Extensionen der Membranproteine enthalten, die aufgrund der Lokalisation des Proteins im Thylakoidlumen am ehesten mit HCF136 interagieren sollten. Insofern war es der Grundgedanke bei der Erstellung der Bank, möglichst kleine Fragmente zu klonieren (s. 2.3.8.2). Das Sichten der Bank wurde ebenfalls mit Hilfe der Kreuzungstechnik durchgeführt (s. Methodenteil 2.3.8.1). Insgesamt wurde eine amplifizierte Bank, die aus rund 30.000 unabhängigen Plastiden-DNA-Klonen hervorgegangen ist, gesichtet. Es konnte keine positive Interaktion mit HCF136 nachgewiesen werden.

In einem dritten Ansatz wurden bestimmte Plastidensequenzen für einen direkten Test auf Interaktion mit dem HCF136-Protein eingesetzt. Dabei handelte es sich in erster Linie um Proteinabschnitte des PS II-Reaktionszentrums. Es wurden DNA-Sequenzen für die luminalen C-Termini von PSII-D1, PSII-D2 und von Cytochrom $b_{559\alpha}$ kloniert (vgl. Tab. 3). Außerdem wurde ein Konstrukt hergestellt, das ein durchgehendes Leseraster aus luminalem Cytochrom $b_{559\alpha}$ -Abschnitt und dem hydrophilen Abschnitt von Cytochrom $b_{559\beta}$ (lt. McNamara *et al.* (1997) ebenfalls luminal) enthält. Ferner wurde der hydrophile Abschnitt von Rubredoxin aus *Arabidopsis thaliana* für den Einsatz im Zwei-Hybrid-System kloniert. Rubredoxin wurde insofern als möglicher Interaktionspartner von HCF136 diskutiert, da das homologe Gen in *Synechocystis* direkt stromaufwärts von Ycf48 lokalisiert ist und somit ein Funktionszusammenhang denkbar war. Zum damaligen Zeitpunkt war die Topologie von Rubredoxin in der Membran noch nicht klar. Inzwischen ist geklärt, daß der hydrophile Arm ins Stroma ragt (Wastl *et al.*, 2000).

HCF136 zeigte im Hefe-Zwei-Hybrid-System mit keinem der angebotenen Proteinabschnitte eine Interaktion.

In einem vierten Versuch wurde das Hefe-Zwei-Hybrid-System verwendet, um auf Interaktion von HCF136 mit sich selbst zu testen. Dazu wurden im Versuch mit direkter Interaktion Vollängen-HCF136 und drei verschiedene Teilabschnitte vom Protein in der Hefe zur Ko-Expression gebracht. Auch hier konnte in keinem Fall ein Wachstum der Hefen auf Selektionsmedium beobachtet werden. HCF136 interagiert im Hefe-Zwei-Hybrid-System nicht mit sich selbst.

3.7.2 Biochemische Quervernetzung

Da der molekularbiologische Ansatz zur Identifizierung möglicher Bindepartner des HCF136-Proteins erfolglos blieb, wurde als Alternative ein biochemischer Ansatz gewählt. Hierbei wurden molekulare Quervernetzer zu Thylakoidsuspensionen gegeben, um mögliche Interaktionen des HCF136-Proteins mit anderen Proteinen zu fixieren. In einer Immunoblotanalyse der aufgetrennten Thylakoidproteine sollten sich anschließend erfolgreiche Quervernetzungen nachweisen lassen.

Die Auswahl des geeigneten Quervernetzers ist von verschiedenen Faktoren abhängig (s. Methodenteil 2.5.15). Da aber die Natur eines möglichen Interaktionspartners nicht bekannt war, mußten verschiedene biochemische Quervernetzer getestet werden. In dieser Arbeit wurden drei sehr unterschiedliche Verbindungen ausgewählt. Die genaue Vorgehensweise bei den Reaktionen ist im Methodenteil 2.5.15 beschrieben. Abb. 25 zeigt eine Zusammenfassung der Ergebnisse:

HCF136 zeigte keine spezifische Quervernetzung beim Einsatz der Quervernetzer APG und DTSSP. Im Falle des EDC dagegen konnte nach ca. 15 min ein höhermolekulares Produkt von ca. 55 kD neben der monomeren Form von HCF136 nachgewiesen werden. Nach ca. 1 Stunde Inkubation der Thylakoide mit EDC sind weitere Quervernetzungsprodukte bei ca. 50 kD, 60 kD und 70 kD erkennbar. Außerdem sieht man einen hochmolekularen Schmier, der jedoch eher für unspezifische Quervernetzung spricht. Das Produkt von 55 kD war abundant genug, um es mit Hilfe der in 2.5.12 beschriebenen HCF136-Antikörpersäule aufzureinigen zu können. Die Identifizierung der in dem Produkt enthaltenen Proteine wird mit Hilfe der Massenspektrometrie im Labor von PD Dr. L. Eichacker (Universität München) durchgeführt (noch nicht abgeschlossen). Ob mit Hilfe des Quervernetzers EDC eine spezifische Interaktion von HCF136 fixiert worden ist, läßt sich derzeit noch nicht sagen. Der Interaktionspartner weist offensichtlich eine Größe von ca. 17 kD auf.

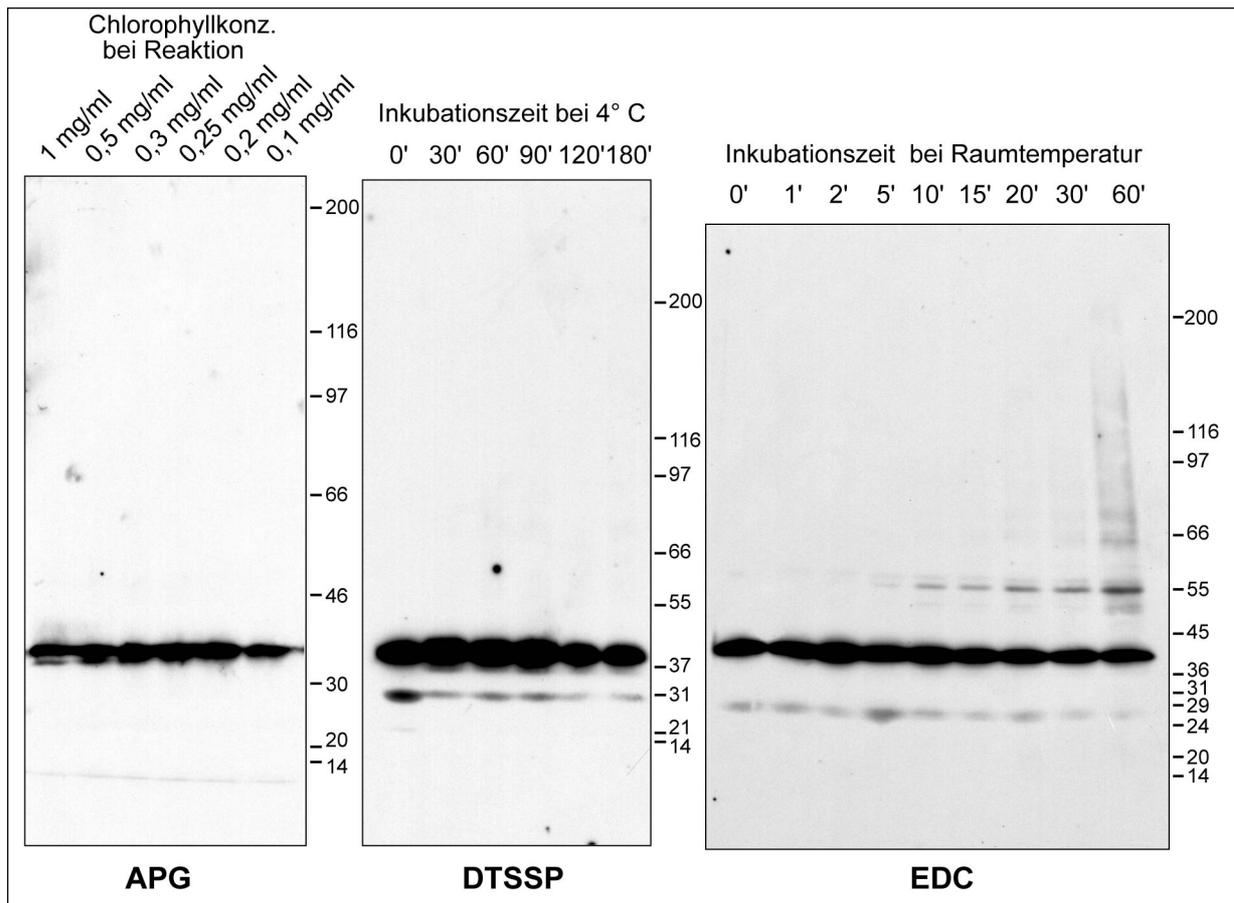


Abb. 28: Einsatz von biochemischen Quervernetzern zum Testen von Interaktionen des HCF136-Proteins mit Zielproteinen. Es wurden jeweils intakte Spinat-Thylakoide eingesetzt. APG (auf einer Seite spezifisch für Arginin-Reste) wurde in einer Konzentration von 5 mM eingesetzt und die Chlorophyllkonzentration als Maß für die Thylakoidkonzentration variiert. Für DTSSP (verbindet primäre Amine) und EDC (verbindet primäre Amine mit Carboxylgruppen) wurden jeweils Reaktionskinetiken untersucht. DTSSP wurde in einer Konzentration von 10 mM eingesetzt. EDC wurde in einer Konzentration von 2 mM eingesetzt; hinzukamen 5 mM Sulfo-NHS als Hilfsreagenz. Die Chlorophyllkonzentration betrug in beiden Fällen 1 mg/ml. Die DTSSP-Reaktion wurde zu den jeweiligen Zeitpunkten durch Zugabe ad 20 mM Tris/HCl-Puffer gestoppt, die EDC-Reaktion durch Zugabe ad 10 mM Hydroxylamin. Die Thylakoidproteine wurden anschließend auf SDS-Polyacrylamid-Gradientengelen (5-12%) aufgetrennt (bei DTSSP ohne Reduktionsmittel) und das Ausmaß einer HCF136-Quervernetzung in Immunoblot-Analysen mit HCF136-Antiserum untersucht. Dazu wurden pro Bahn jeweils Proteine entsprechend 10 µg Chlorophyll verwendet.

3.8 Untersuchungen zur Assoziation des HCF136-Proteins mit Subkomplexen des Photosystems II

Die bisherigen Versuche haben die essentielle Bedeutung des HCF136-Proteins für die posttranslationalen Schritte in der Biogenese des Photosystems II unterstrichen. Daraus konnte die Vermutung abgeleitet werden, daß der Faktor mit Teilen des Komplexes selbst zumindest zeitweise assoziiert sein sollte. Um dies zu bestätigen, wurden in den folgenden Untersuchungen native Trenntechniken eingesetzt, die eine Größenfraktionierung der Membrankomplexe aus der Thylakoidmembran erlauben und auch die Auftrennung von Assemblierungsintermediaten des Photosystems II ermöglichen.

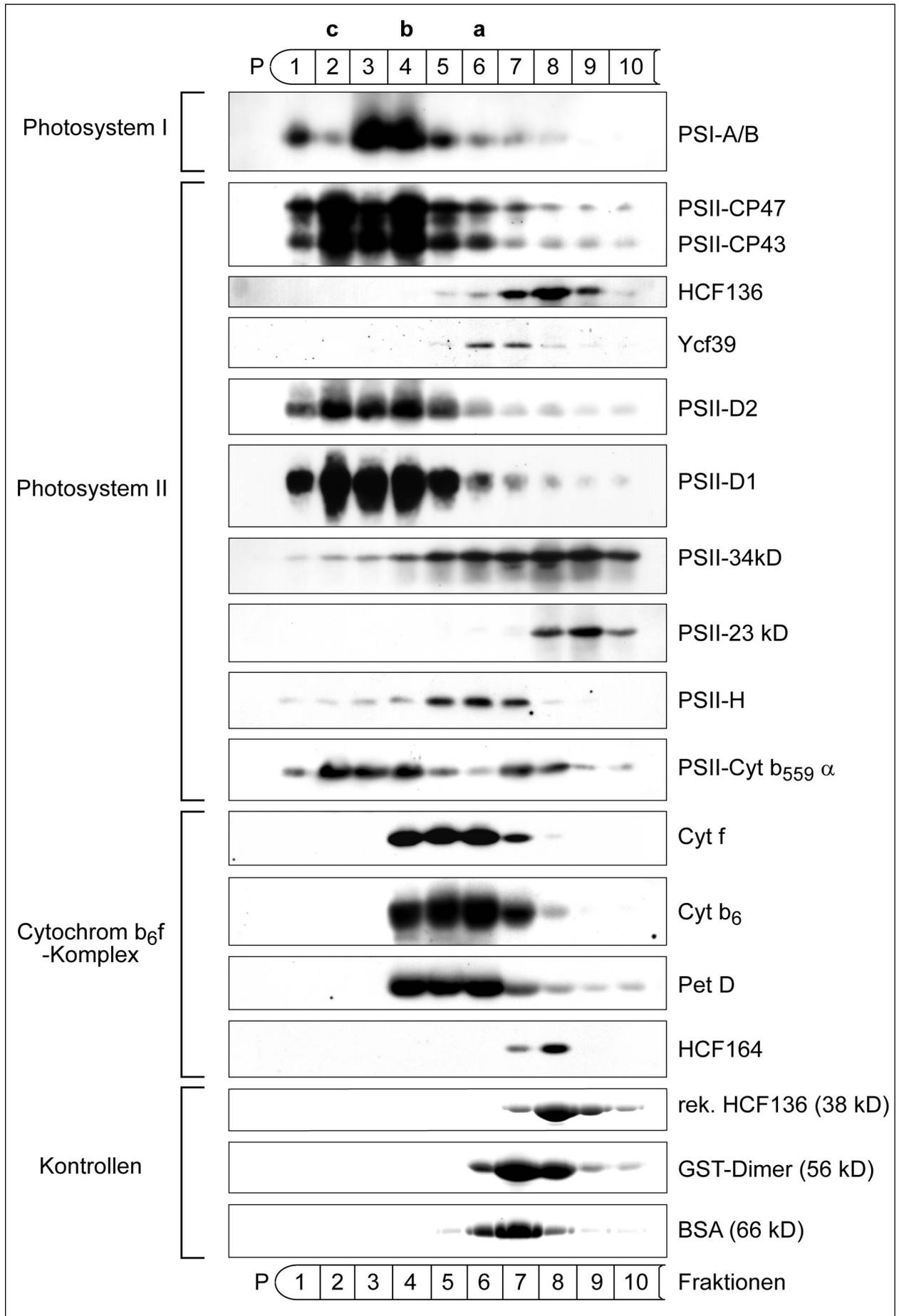
3.8.1 Lokalisation des HCF136-Proteins im Saccharose-Dichtegradienten solubilisierter Gerste-Thylakoide

Der Einsatz des Detergenz n-Dodecyl- β -D-maltosid erlaubt eine weitgehend komplexerhaltende Solubilisierung von Thylakoidmembranen. Die anschließende Auftrennung der Vesikel nach ihrer Größe durch Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation ist eine bevorzugte Methode, um die Membrankomplexe voneinander zu trennen (z.B. van Wijk *et al.*, 1996). Im vorliegenden Experiment wurden Gerste-Thylakoide auf diese Weise aufbereitet. Der Nachweis repräsentativer Untereinheiten der Membrankomplexe in den einzelnen Fraktionen des Dichtegradienten erfolgte durch Immunoblot-Analyse.

Bei der Auftrennung solubilisierter Chloroplasten-Thylakoide im Saccharose-Dichtegradienten (Abb. 26) konnten vollständig assemblierte Komplexe des Photosystems II, des Photosystems I und des Cytochrom b_6f -Komplexes in den hochmolekularen Fraktionen nachgewiesen werden. Die Identifizierung der Komplexe erfolgte durch Vergleich der Proteinverteilung mit den Ergebnissen aus Müller & Eichacker (1999). So konnten für die Untereinheiten des Photosystems II zwei Verteilungsmaxima im Dichtegradienten erkannt werden: Fraktion 2 enthält demnach die Mizellen des Photosystem II-Kernkomplex-Dimers (Core 2) und Fraktion 4 die Mizellen des PS II-Kernkomplex-Monomers (Core 1). Das Reaktionszentrum aus D1, D2 und Cytochrom b_{559} dürfte demnach hauptsächlich in der Fraktion 6 enthalten sein. Die Proteine D1, D2, CP47, CP43 und Cytochrom $b_{559\alpha}$ zeigen in ihrer Verteilung im Gradienten diese beiden typischen Maxima. Aufgrund der verschiedenen Assemblierungsintermediate liegen diese Proteine aber auch in allen anderen Fraktionen vor. Die Auflösung des Saccharose-Dichtegradienten reicht nicht aus, um diese Intermediate voneinander zu trennen. Cytochrom b_{559} zeigt eine weitere auffällige Häufung in den Fraktionen 7 und 8.

Das PSII-34kD-Protein wurde durch die Solubilisierungsprozedur offenbar größtenteils von den Kernkomplexen des PS II abgelöst. Es zeigt als Monomer eine Maximalverteilung in den Fraktionen 8 und 9. Seine Häufigkeit nimmt in Richtung der höhermolekularen Komplexe stetig ab. Das PSII-23kD-Protein scheint nach Solubilisierung ausschließlich als Monomer vorzuliegen.

Abb. 26: Lokalisation von HCF136, HCF164, Ycf39 und repräsentativer Strukturproteine vom Photosystem I, vom Photosystem II und vom Cytochrom b_6f -Komplex im linearen Saccharose-Dichtegradienten solubilisierter Chloroplasten-Thylakoide. Chloroplasten-Thylakoide wurden mit 1.5% (w/v) n-Dodecyl- β -D-maltosid solubilisiert und die Proteinkomplexe anschließend durch Dichtezentrifugation in einem linearen Saccharosegradienten aufgetrennt. Die Fraktionen wurden von unten nach oben geerntet, mit 10% (w/v) TCA gefällt und anschließend einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese in Gegenwart von 4 M Harnstoff unterzogen. Nachgewiesen wurden die einzelnen Proteine mittels Immunotransferanalyse. Als Kontrollen wurden rekombinantes HCF136, Glutathion-S-Transferase (GST) und Rinderserumalbumin (BSA) auf gleiche Weise solubilisiert, aufgetrennt und die Proteine im Polyacrylamidgel durch Coomassie-Färbung nachgewiesen. Die Lokalisation von PSII-H wurde erstmals durchgeführt. a) Lage des PS II-Reaktionszentrums (PSII-RC) und des pseudomonomeren Cytochrom b_6f -Komplexes; b) Lage des monomeren PS II-Kernkomplexes (PSII-Core (I)) und des dimeren Cytochrom b_6f -Komplexes; c) Lage des dimeren PS II-Kernkomplexes (PS II-Core (II)). Die Lage der einzelnen Komplexe wurde durch Vergleich mit den Ergebnissen aus der Dissertation von Dr. B. Müller (2000) ermittelt.



Das PsbH-Protein zeigt nicht die gleiche Verteilung im Dichtegradienten wie die Proteine des PS II-Kernkomplexes. Seine Verteilung wurde in dieser Arbeit erstmals untersucht, da ein Antiserum bislang nicht verfügbar war. Für PsbH findet man eine Maximalverteilung in den Fraktionen 5, 6 und 7. Es liegt hier vermutlich als ein Subkomplex aus peripheren Photosystem II-Proteinen vor.

Anhand des PS I-A/B-Verteilungsmusters kann der PS I-Kernkomplex in den Fraktionen 3 und 4 lokalisiert werden. Der Cytochrom b_6f -Komplex besitzt im Gradienten eine hauptsächliche Verteilung in den Fraktionen 4, 5 und 6, was durch die Lokalisation der Untereinheiten Cytochrom f , Cytochrom b_6 und PetD angezeigt wird. Fraktion 4 enthält vermutlich die aktive Form, nämlich den Cytochrom b_6f -Komplex als Dimer. In Fraktion 6 liegt vermutlich das Pseudomonomer (ohne Rieske-Protein) vor.

Das HCF136-Protein zeigt in solubilisierten und aufgetrennten Chloroplasten-Thylakoiden eine maximale Akkumulation in Fraktion 8. Darüber hinaus kann das Protein auch noch deutlich in den Fraktionen 7 und 9 nachgewiesen werden. Geringe Mengen von HCF136 sind in den höhermolekularen Fraktionen 5 und 6 zu erkennen. Um diese Verteilung bewerten zu können, wurden Kontrollproteine auf gleiche Weise solubilisiert und im Dichtegradienten aufgetrennt (Abb. 26 unten). Demnach zeigt rekombinantes HCF136-Protein eine maximale Akkumulation in Fraktion 8 und ist nur noch in geringen Mengen in Fraktion 7 nachweisbar. Daraus ergibt sich, daß der größte Teil des HCF136-Proteins aus Gerste-Thylakoiden sich im Saccharose-Dichtegradienten wie ein Monomer verteilt, während ein kleiner Teil des Proteinpools in höhermolekulare Bereiche verschoben ist. Die Fraktion 7 stellt dabei den Übergang zwischen monomeren und komplexen HCF136-Mizellen dar. Aufgrund der Kontrollproteine GST und BSA kann eine Größenabschätzung der höhermolekularen Teile des HCF136-Pools durchgeführt werden. Demnach liegen HCF136-Komplexe in der Fraktion 7 von mindestens 66 kD Größe vor, in den Fraktionen 5 und 6 liegen bereits Komplexe im Größenbereich des Photosystem II-Reaktionszentrums von rund 120 kD vor. Eine Überlappung dieser höhermolekularen HCF136-Fraktion mit Teilen der Kernkomplex-Untereinheiten vom Photosystem II (z.B. D2, D1) könnte auf eine Assoziation mit diesen Proteine hindeuten.

HCF136 ist eindeutig nicht Bestandteil eines fertig assemblierten PS II-Komplexes. Inwieweit dieses Ergebnis typisch für Biogenese-Faktoren ist, sollte durch zwei weitere Kontrollen überprüft werden. Außerdem wurden für diese Kontrollen integrale Membranproteine ausgewählt. Dadurch sollte zusätzlich untersucht werden, ob HCF136 als peripheres Membranprotein sich möglicherweise anders im Gradienten verteilt als membranintegrale Biogenesefaktoren.

Das Ycf39-Protein ist ein Hilfsfaktor für die Biogenese des Photosystems II, der wahrscheinlich an der Plastochinon-Einbindung in das D2-Protein beteiligt ist. Ycf39 ist ebenfalls nicht Bestandteil fertig assemblierter PS II-Komplexe. Als Monomer sollte es aufgrund seiner Größe (35 kD) hauptsächlich in den Fraktionen 8 und 9 vertreten sein. Tatsächlich zeigt es jedoch eine Verschiebung in die Fraktionen 6 und 7. Das Protein scheint somit hauptsächlich in einem Subkomplex vorzuliegen. Eine Überlappung mit dem D2-Protein in diesen Fraktionen könnte die von Ermakova-Gerdes & Vermaas (1999) vorgeschlagene Interaktion zwischen beiden Proteinen unterstützen.

Das Protein HCF164 ist essentiell für die Biogenese des Cytochrom b_6f -Komplexes (Lennartz *et al.*, eingereichtes Manuskript 2000), aber seine Lokalisation in den Fraktionen 7 und 8 des

Dichtegradienten zeigt, daß es nicht Bestandteil des Komplexes sein kann. Dennoch liegt das Protein mit einer Größe von 26 kD offenbar nicht als Monomer vor, da es dann ähnlich wie das PSII-23kD-Protein hauptsächlich in der Fraktion 9 vertreten sein sollte. Es kann somit spekuliert werden, daß HCF164 nach Solubilisierung als Minikomplex mit einem kleinen Interaktionspartner von ca. 10-15 kD vorliegt.

Insgesamt ist festzustellen, daß keiner der drei Hilfsfaktoren HCF136, Ycf39 und HCF164 Bestandteil des jeweiligen Komplexes ist, für dessen Biogenese er essentiell ist. Während allerdings Ycf39 und HCF164 noch ausschließlich als Subkomplexe und so gut wie gar nicht als Monomere vorliegen, sieht die Situation bei HCF136 anders aus: Nur ein kleiner Teil des HCF136-Pools zeigt nach der Solubilisierung mit n-Dodecyl- β -D-maltosid eine Verschiebung in den höhermolekularen Bereich des Gradienten. Demgegenüber scheint der größte Anteil des Proteins als Monomer vorzuliegen. Offenbar ist dies in der Tat auf seine Natur als peripheres Membranprotein zurückzuführen. Letztendlich wird dieses Ergebnis unterstützt durch die Verteilung der extrinsischen Proteine PSII-34kD und PSII-23kD im Dichtegradienten, die ebenfalls größtenteils von den Kernkomplexen des PS II abgelöst wird.

3.8.2 Lokalisation von HCF136 im Saccharose-Dichtegradienten von Etioplasten-Prothylakoiden aus Gerste – Lichtinduzierte Biogenese des Photosystems II

In Gerste-Etioplasten konnte die Assemblierung eines PS II-Präkomplexes bestehend aus pD1, D2 und Cytochrom b_{559} nachgewiesen werden (Müller & Eichacker, 1999). Dieser Präkomplex ist allerdings instabil und wird zügig wieder abgebaut, solange keine Chlorophyll a-Pigmente eingebaut werden. Da HCF136 bereits in Etioplasten gebildet wird (vgl. 3.5.4), also zum frühestmöglichen Zeitpunkt der Biogenese bereits zur Verfügung steht, wurden Etioplasten-Prothylakoide aus Gerste solubilisiert und auf einem linearen Saccharose-Dichtegradienten aufgetrennt. Dadurch sollte geprüft werden, ob HCF136 in Etioplasten Bestandteil eines Präkomplexes des Photosystems II ist.

Das Experiment wurde dahingehend erweitert, daß Gerste-Etioplasten in einem zweiten Ansatz nach der Isolation im Sicherheitslicht 15 min bei Dunkelheit (Vortranslation) und anschließend 15 min im Licht und 25° C inkubiert wurden. Durch die Lichtinkubation sollte die Chlorophyll-Synthese ausreichend induziert werden, so daß die Assemblierung stabiler Reaktionszentren möglich wird. Auch diese Prothylakoide wurden solubilisiert und im Dichtegradienten aufgetrennt. Die Lokalisation von HCF136 innerhalb des Gradienten sollte also letztendlich klären, ob das Protein bereits in die ersten Assemblierungsschritte der lichtinduzierten PS II-Biogenese involviert ist.

Die Verteilung von HCF136 im Saccharose-Dichtegradienten von solubilisierten Etioplasten-Prothylakoiden ist in Abbildung 27A dokumentiert und ist vergleichbar mit der Verteilung des rekombinanten HCF136-Proteins (s. 3.8.1). Ganz offensichtlich liegt in unbelichteten Etioplasten sämtliches HCF136-Protein nach der Solubilisierung mit n-Dodecyl- β -D-maltosid noch als Monomer vor. Anders sieht die Situation aus, wenn Etioplasten zuvor im Licht inkubiert worden sind (s. Abb. 27B). Zwar liegt auch hier der größte Teil des HCF136-Proteins als Monomer vor, jedoch zeigt ein Teil des HCF136-Pools nun eine Verschiebung in den höhermolekularen Bereich (Fraktionen 4, 5 und 6). Dies ist ein deutliches Indiz dafür, daß HCF136 bei der lichtinduzierten PS II-Biogenese mit anderen Proteinen wechselwirkt.

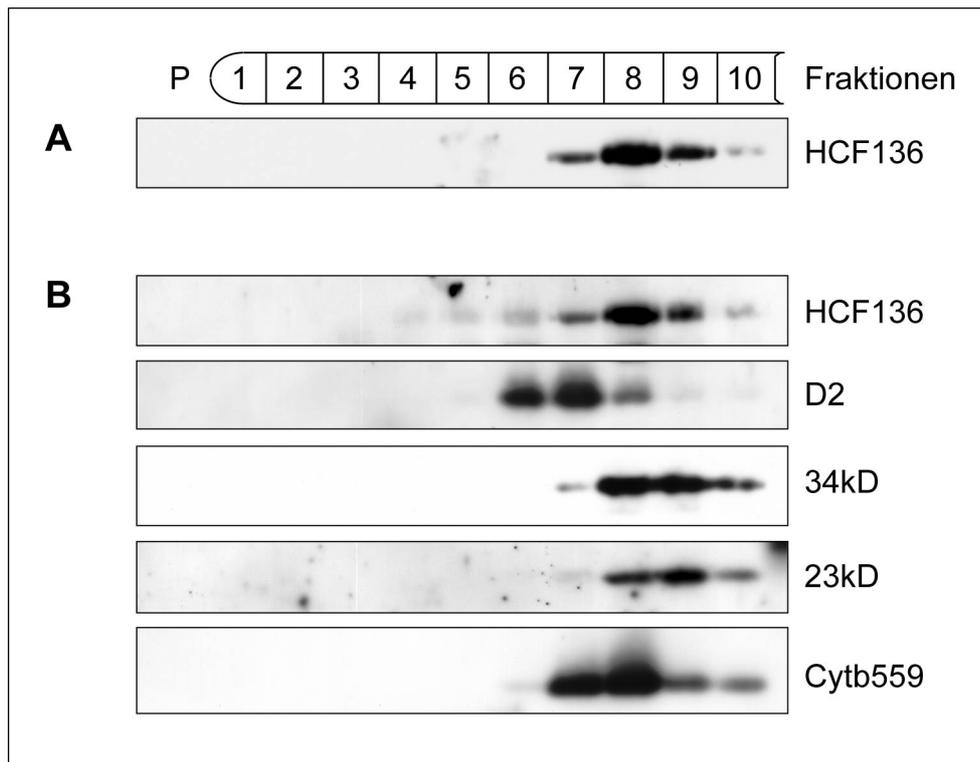


Abb. 27: Lokalisation von HCF136 und Photosystem II-Proteinen im Saccharose-Dichtegradienten von solubilisierten Etioplasten-Prothylakoiden aus Gerste. Vor der osmotischen Lyse wurden die Etioplasten 15 Min. im Dunkeln (A) bzw. 15 min im Licht (B) inkubiert.

Über die Immunoblot-Analyse lassen sich vom PS II-Reaktionszentrum die Proteine D2 und Cytochrom $b_{559\alpha}$ in belichteten Etioplasten nachweisen, während sich das D1-Protein nicht immunologisch nachweisen lässt. Die kernkodierte extrinsische Untereinheit PSII-34kD und PSII-23kD akkumulieren in deutlich nachweisbaren Mengen.

Eine Überlappung der höhermolekularen Fraktion von HCF136 mit dem D2-Protein könnte auf eine Interaktion hindeuten. Das D2-Protein liegt hauptsächlich in den Fraktionen 6 und 7 vor. Allerdings begrenzt die mangelnde Sensitivität der Immunoblot-Analyse die Sicht auf die komplette D2-Verteilung: Bei radioaktiver Markierung der Prothylakoidproteine (s. Abb. 29) kann man das D2-Protein auch noch in höhermolekularen Bereichen erkennen, geringe Mengen sogar in den Fraktionen 3 und 4. Der größte Teil des D2-Pools liegt jedoch in den Fraktionen 6 und 7 vor. Das D2-Protein besitzt eine ähnliche Größe wie das 34kD-Protein und sollte als Monomer entsprechend hauptsächlich in den Fraktionen 8 und 9 vertreten sein. Es liegt aber ganz offensichtlich nicht als freies Protein vor. Vielmehr deutet die Lokalisation in den Fraktionen 6 und 7 auf einen Komplex von ca. 66 kD oder größer hin. Vermutlich liegt D2 in den Fraktionen 6 und 7 als Präkomplex oder Reaktionszentrenkomplex mit D1 und Cytochrom b_{559} vor. Eine Interaktion eines Teils des D2-Pools mit HCF136 ist aber aufgrund der HCF136-Verteilung auch denkbar. Aufgrund der überlappenden Verteilungsmuster kann ein Komplex bestehend aus HCF136, D2 und Cytochrom b_{559} durchaus postuliert werden. Allerdings scheint HCF136 auch noch mit größeren Subkomplexen des Photosystems II zu assoziieren, da in belichteten Etioplasten der höhermolekulare Bereich des HCF136-Pools bis in Fraktion 4 reicht, was bei Chloroplasten der Größe des RC-CP47-Komplexes (ca. 170 kD) entsprechen würde.

3.8.3 Ko-Immunopräzipitationsexperimente zur Ermittlung von HCF136-Interaktoren

Anhand der Dichtegradienten-Auftrennung solubilisierter (Pro-)Thylakoide konnte ein Teil des HCF136-Pools in höhermolekularen Subkomplexen nachgewiesen werden. Um diese Interaktionspartner eindeutig zu identifizieren, sollten Ko-Immunopräzipitationsexperimente mit Hilfe des zur Verfügung stehenden hochspezifischen HCF136-Antiserums durchgeführt werden.

Zunächst wurde ein Vorversuch durchgeführt, der sicherstellen sollte, daß der HCF136-Antikörper auch unter den bei der Dichtegradienten-Zentrifugation vorliegenden Bedingungen sein Zielprotein mit hoher Affinität bindet. Dazu sollte das HCF136-Protein immunologisch aus solubilierten Spinat-Thylakoiden aufgereinigt werden (Abb. 28).

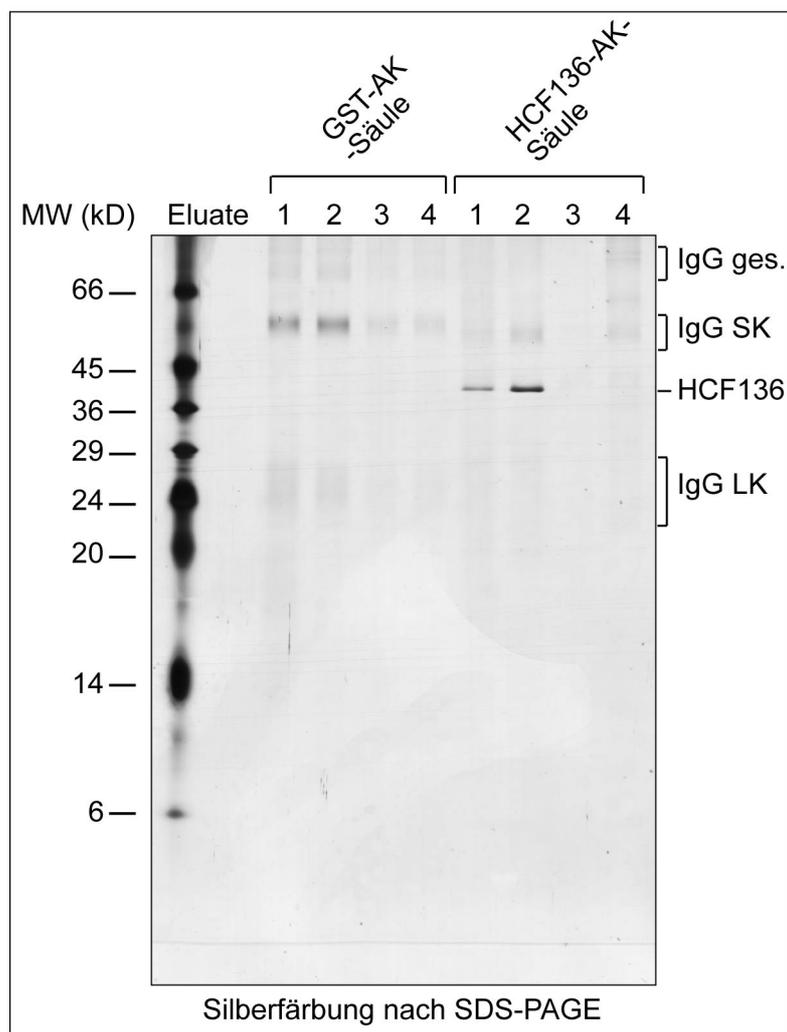


Abb. 28: Affinitätschromatographie solubilisierter Spinat-Chloroplastenthylakoide mit Hilfe von Antikörpersäulen. Spinat-Thylakoide wurden mit 1.5 % n-Dodecyl- β -D-maltosid solubilisiert, auf eine Konzentration von 0.06 % n-Dodecyl- β -D-maltosid verdünnt und anschließend über eine mit HCF136-Antikörpern bestückte Säule geschickt (GST-Antikörpersäule als Kontrolle). Die Waschung erfolgte mit 2 Säulenvolumen TMK-Puffer + 0.03 % n-Dodecyl- β -D-maltosid. Die Elution erfolgte unter sauren Bedingungen (siehe Methodenteil 2.5.13.2). Die Eluatfraktionen wurden neutralisiert, mit 10% (w/v) TCA gefällt und auf einem SDS-PAGE aufgetrennt.

Spinat-Thylakoide wurden zunächst mit 1.5% (w/v) n-Dodecyl- β -D-maltosid solubilisiert. Durch Verdünnung der Lösung wurde die Konzentration an Detergenz auf 0.06% (w/v) gesenkt. Anschließend konnte HCF136 aus dieser Lösung mit Hilfe des an einer Sepharose immobilisierten HCF136-Antikörpers aufgereinigt werden (Abb. 28). Zur Negativkontrolle wurde eine Sepharose eingesetzt, an die Antikörper gegen Glutathion-S-Transferase gekoppelt waren. Die Aufreinigung von HCF136 aus Gesamt-Thylakoiden verlief erfolgreich, wenngleich die Eluate durch miteluierte Antikörper verunreinigt waren. So kann man neben einer deutlichen Bande für HCF136 auch charakteristische IgG-Banden (Gesamt-IgG, schwere IgG-Kette, leichte IgG-Kette) nach Silberfärbung der Polyacrylamidgele erkennen. Das aufgereinigte HCF136-Protein konnte nun für eine N-terminale Anequenzierung verwendet werden (wird zur Zeit im Labor von PD Dr. L. Eichacker, Universität München durchgeführt).

Nachdem der Nachweis erbracht wurde, daß HCF136 mit Hilfe des Antikörpers aus solubilisierten Membranen aufgereinigt werden kann, sollten nun ausgewählte Fraktionen des Saccharose-Dichtegradienten solubilisierter Gerste-Prothylakoide aus 3.8.2 für eine Ko-Immunopräzipitation eingesetzt werden. Insbesondere in den Fraktionen 5 und 6, wahrscheinlich aber auch in Fraktion 7 liegt das HCF136-Protein nicht als Monomer vor, sondern ist mit anderen Proteinen assoziiert. Insofern sollte bei immunologischer Aufreinigung des Proteins eine Ko-Immunopräzipitation der Interaktionspartner in diesen Fraktionen möglich sein. Zur Steigerung der Empfindlichkeit der Methode wurden die Etioplasten vor der Lyse einer *in organello*-Translation in Gegenwart von ^{35}S -Methionin unterzogen. Ferner erfolgte diese Translation wie in 3.8.2 in Gegenwart von Licht, da HCF136 bei der lichtinduzierten PS II-Biogenese in den höhermolekularen Fraktionen nachgewiesen werden konnte. Die Auftrennung der radioaktiv markierten Thylakoidproteine ist in Abb. 29A illustriert. Als Negativ-Kontrolle für die Ko-Immunopräzipitation mit dem HCF136-Antiserum wurde eine parallele Ko-Immunopräzipitation der Fraktionen mit HCF164-Antiserum durchgeführt. Dieses Antiserum zeigt nachweislich keine Kreuzreaktionen mit Photosystem II-Untereinheiten und wurde auf gleiche Weise affinitätschromatographisch aufgereinigt, wie das HCF136-Antiserum.

In Abb. 29B/C ist das Ergebnis der Ko-Immunopräzipitation zusammengefaßt. Abb. 29B zeigt auf der linken Seite, daß bei Waschung der Protein A-Sepharose mit n-Dodecyl- β -D-maltosidhaltigem-TMK-Puffer kein radioaktiv markiertes Protein mehr gebunden bleibt. Man erkennt bei Verwendung beider Antiseren lediglich eine unspezifische Hintergrund-Markierung sowie eine schwache Markierung der schweren IgG-Kette bei ca. 50 kD. Schon die geringe Konzentration von 0.06% (w/v) n-Dodecyl- β -D-maltosid im Waschpuffer reicht offensichtlich aus, um die Interaktion zwischen HCF136 und seinen Interaktionspartnern zu zerstören. Wurde hingegen auf Detergenz im Waschpuffer verzichtet, so haben zahlreiche Proteine unspezifisch am Antikörper oder an der Protein A-Sepharose gebunden (Abb. 29C) – unabhängig vom jeweiligen Antiserum. Da HCF136 zudem in den Fraktionen 8 und 9 nur als Monomer vorliegt, hätte hier kein Protein mitgefällt werden dürfen. Dies ist aber der Fall, was eindeutig für unspezifische Bindung spricht. Zu den mitpräzipitierten Proteinen zählen vermutlich pD1/D1, D2, CP47, das 23kD-Abbauprodukt von D1 und möglicherweise die Cytochrom $b_{559}\alpha$ -Untereinheit. Diese Proteine kommen zwar als mögliche Interaktionspartner von HCF136 in Frage, jedoch ist das Ergebnis nicht brauchbar, da bei der Negativkontrolle die gleichen Proteine mitgefällt worden sind. Die Präzipitationsmuster sind dem Markierungsmuster der Etioplasten-Prothylakoide sehr ähnlich, was eindeutig für unspezifische Fällung spricht.

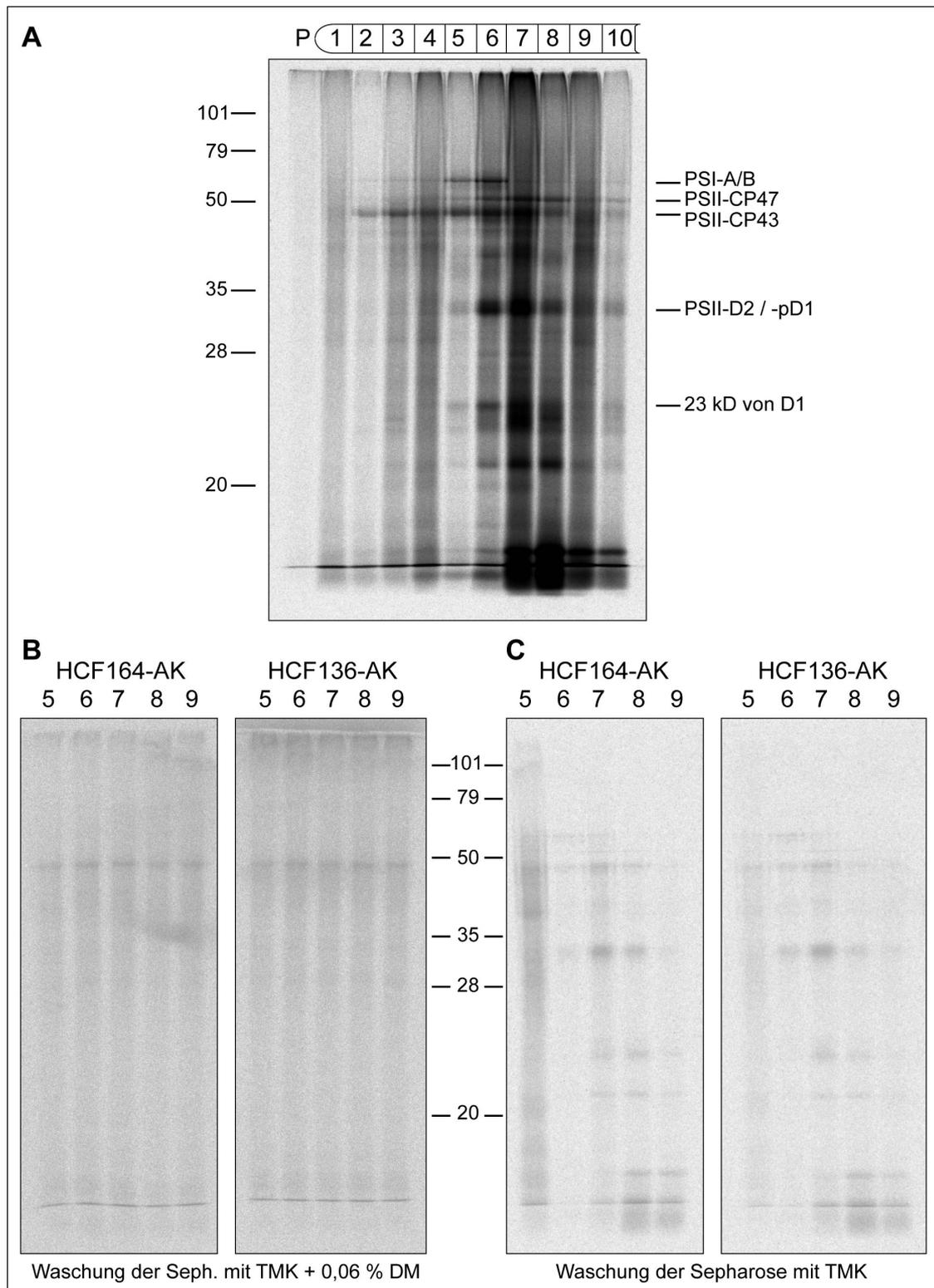


Abb. 29: Ko-Immunopräzipitation in ausgewählten Fraktionen eines Saccharose-Dichtegradienten solubilisierter Etioplasten-Prothylakoide aus Gerste. A) Verteilung der radioaktiven Markierung im Saccharose-Dichtegradienten nach der Ultrazentrifugation. Vor der Solubilisierung der Etioplasten-Prothylakoide wurde eine *in organello*-Translation von 15 min bei Dunkelheit und anschließend eine Translation von 15 min bei Licht durchgeführt. Die Proteine wurden anschließend wie in Abb. 23 beschrieben für die Gelelektrophorese vorbereitet. B, C) Ko-Immunopräzipitation in den angegebenen Fraktionen mit HCF136- und HCF164-Antikörper (Kontrolle). Die Waschung der Protein A-Sepharose erfolgte in B mit und in C ohne das Detergenz n-Dodecyl- β -D-maltosid. Es wurde jeweils die Hälfte des Präzipitats für die Gelelektrophorese verwendet.

Ein analoger Versuch zur Ko-Immunopräzipitation wurde auch mit ausgewählten Fraktionen des Saccharose-Dichtegradienten solubilisierter Chloroplasten-Thylakoide durchgeführt (siehe 3.8.1). Bei Waschung der Sepharose mit detergentenhaltigem TMK-Puffer konnte ähnlich wie bei den Etioplasten-Prothylakoiden kein mitgefälltes Protein mehr in den Eluaten nachgewiesen werden (ohne Abb.). Wurde auf Detergenz bei den Waschungen verzichtet, so konnten erneut lediglich unspezifische Interaktionen nachgewiesen werden. Demnach war die Ko-Immunopräzipitation nicht geeignet, um die im Saccharose-Dichtegradienten offensichtlichen Assoziationen von HCF136 mit PS II-Subkomplexen zu beweisen und die Interaktionspartner zu identifizieren.

3.9 Native Gelelektrophorese *in vivo* markierter *Arabidopsis*-Keimlinge – Vergleich zwischen den Mutanten *hcf136*, *hcf154*, *hcf109* und dem Wildtyp

Die Blue-Native-Polyacrylamidgelelektrophorese stellt neben der Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation eine alternative Möglichkeit zur Auftrennung von solubilisierten Proteinkomplexen aus Membranen nach ihrer Mizellengröße dar. Im Vergleich zum Saccharose-Dichtegradienten ist das Auflösungsvermögen der Auftrennung deutlich besser und in Verbindung mit einer anschließenden Auftrennung der Komplexe in der zweiten Dimension durch konventionelle SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese werden verschiedene Subkomplexe des PS II identifizierbar (Müller, 2000).

Die Ergebnisse zur Auftrennung solubilisierter Etioplasten-Prothylakoide im Saccharose-Dichtegradienten lieferten den Hinweis, daß HCF136 bei der lichtinduzierten Biogenese des Photosystems II möglicherweise mit PS II-Subkomplexen assoziiert ist. Daraus ergab sich die Vermutung, daß dieser Faktor am Assemblierungsprozeß des Komplexes beteiligt ist. Die Blue-Native/2D-Gelelektrophorese sollte daher hier angewendet werden, um Thylakoidkomplexe aus *in vivo*-markierten *Arabidopsis*-Keimlingen aufzutrennen. Auf diese Weise sollte das schrittweise Assemblierungsgeschehen des Photosystems II in Wildtyp- und Mutantenkeimlingen verfolgt werden. Bei der *in vivo*-Markierung in Gegenwart des Antibiotikums Cycloheximid wird die cytosolische Translation praktisch komplett gehemmt, so daß letztendlich das Markierungsmuster der Plastide analysiert werden kann. Die Markierung in den Mitochondrien ist im allgemeinen relativ schwach und kann daher vernachlässigt werden. Daher war es nicht notwendig, aus den Keimlingen Thylakoide zu isolieren, sondern es konnten nach der Markierung Gesamtmembranen für die Blue-Native/2D-Auftrennung präpariert werden.

Abb. 30: Autoradiographien von Blue-Native/2D-Auftrennungen *in vivo*-markierter *Arabidopsis thaliana*-Thylakoide aus Wildtyp- und *hcf136*-Keimlingen. In der Mitte ist ein entsprechender Streifen einer Immunoblot-Analyse des Wildtyps dargestellt. Hierbei wurden Antiseren gegen D1, D2, CP47 und HCF136 eingesetzt. Die entsprechenden Lagen der unterschiedlichen Assemblierungskomplexe des Photosystems II wurden durch gestrichelte Linien verdeutlicht. Core (II): dimerer PS II-Kernkomplex; Core (I): monomerer PS II-Kernkomplex; RC-CP47: PS II-Reaktionszentrum mit CP47; RC: PS II-Reaktionszentrum. Durch Ellipsen wird die deutlich unterschiedliche Akkumulation bestimmter monomerer Proteine (LSU: große Untereinheit der RubisCO, CP47, CP43, pD1/D2) und des 23kD-Abbauproduktes vom D1-Protein hervorgehoben. Eine hochmolekulare Form des CP43 wird im Wildtyp und in der Mutante in gleichen Menge angehäuft; auch dieses Bande wird durch Ellipsen hervorgehoben.

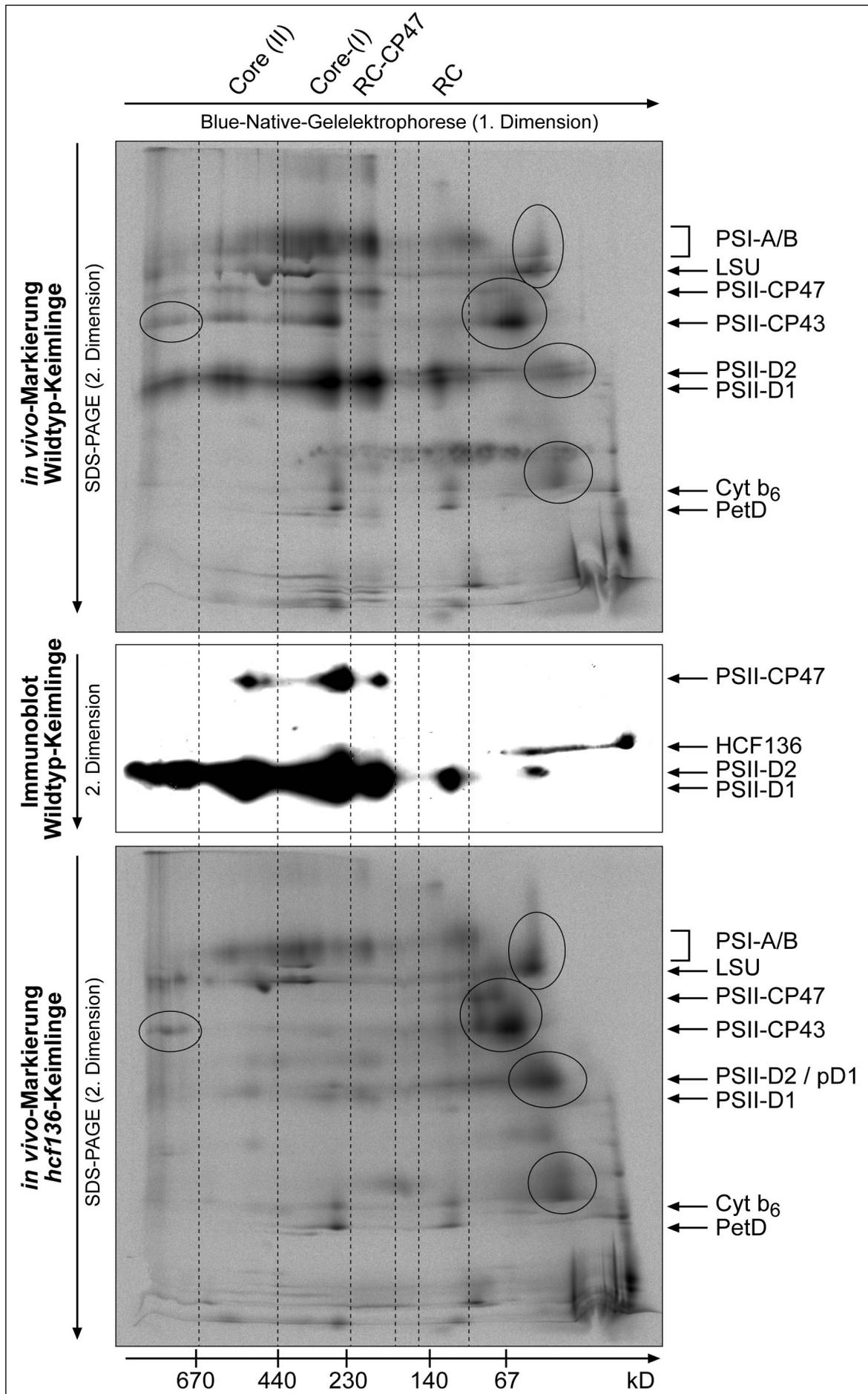


Abb. 30 (oben) zeigt die Autoradiographie des Wildtyps von *Arabidopsis thaliana*. In der Mitte ist ein entsprechender Streifen einer Immunoblot-Analyse dargestellt. Aufgrund der Voruntersuchungen von Dr. B. Müller an Gerste-Plastiden können verschiedene Untereinheiten des Photosystems II (CP47, CP43, D2, pD1, D1), des Photosystems I (PSI-A/B) und des Cytochrom b_6f -Komplexes (Cytochrom b_6 und PetD) identifiziert werden. Die große Untereinheit der RubisCO (LSU) war ebenfalls an ihrem typischen Bandierungsmuster erkennbar. Bei der Betrachtung der Photosystem II-Untereinheiten können folgende Assemblierungsintermediate beobachtet werden: Das kleinste Assemblierungsprodukt des D2-Proteins hat eine Größe von ca. 66 kD. Möglicherweise liegt es hier als Produkt mit D1 vor. Das Reaktionszentrum aus D1, D2 und Cytochrom b_{559} liegt unterhalb von 140 kD. Hier kann man sowohl D2 als auch D1 eindeutig erkennen. Durch Anlagerung von CP47 entsteht der RC-CP47-Komplex unterhalb von 230 kD. Erst bei weiterer Anlagerung von CP43 wird der PS II-Kernkomplex oberhalb von 230 kD geliefert. Durch Anlagerung der kernkodierten Proteine PSII-34kD, PSII-23kD und PSII-16kD sowie durch Dimerisierung wird schließlich der dimere PS II-Kernkomplex geliefert (440-670 kD). Es gibt auch noch höhermolekulare Assemblierungsprodukte des PS II oberhalb von 670 kD, deren Identität noch nicht geklärt ist. Die Assemblierung des Photosystems I wird hier nicht im Detail betrachtet. Wichtig ist lediglich der Vergleich des Markierungsmusters mit dem der Mutanten. Der Cytochrom b_6f -Komplex zeigt lediglich zwei Assemblierungsprodukte: Bei ca. 120 kD liegt das Pseudomonomer aus Cytochrom f , Cytochrom b_6 und PetD vor. Das Rieske-Protein ist nicht Bestandteil dieses Assemblierungsintermediates (Müller, 2000). Bei ca. 230 kD liegt der dimere Cytochrom b_6f -Komplex mit den vier größeren Untereinheiten Cyt f , Cyt b_6 , Rieske und PetD vor. Im Markierungsmuster sind lediglich Cytochrom b_6 und PetD zu erkennen. Sie dienen vor allem als Kontrolle der radioaktiven Markierung im Wildtyp und in den Mutanten.

Die Immunoblot-Analyse der Blue-Native/2D-Auftrennung von Wildtyp-Thylakoiden ermöglicht die Lokalisation von HCF136. Der größte Anteil des HCF136-Proteins liegt wie auch schon beim Saccharose-Dichtegradienten als freies Monomer vor. Ein Teil des HCF136-Proteins zeigt auch in der Blue-Native/2D-Auftrennung eine Verschiebung in den höhermolekularen Bereich. Dieser höhermolekulare Bereich stellt offensichtlich jene HCF136-Fraktion dar, die mit anderen Proteinen wechselwirkt. Eine Komigration mit dem D2-Protein bei ca. 66 kD könnte auf eine Interaktion dieser beiden Proteine hindeuten. Insofern bestätigt die Immunoblot-Analyse der Blue-Native/2D-Auftrennung die Ergebnisse der Analyse des Saccharose-Dichtegradienten solubilisierter Chloroplasten-Thylakoide. Interessanterweise ist das höhermolekulare HCF136 nicht als ein distinkter Punkt im Immunoblot nachweisbar, sondern man erkennt einen kontinuierliche Verteilung, die bis zu einer Größe von mindestens 70 kD reicht.

Die *in vivo*-Markierung in der Mutante *hcf136* und die anschließende Blue-Native/2D-Auftrennung der Thylakoidkomplexe ist in Abb. 30 (unten) zu sehen. Die Verteilung der Subkomplexe des PS I zeigt deutlich, daß die Assemblierung dieses Komplexes in der Mutante *hcf136* normal abläuft und die gleichen hochmolekularen Produkte wie beim Wildtyp liefert. Die Translation des PS I-A/B vollzieht sich allerdings auf niedrigerem Niveau, verglichen mit dem Wildtyp. Des Weiteren ist die Assemblierung des Cytochrom b_6f -Komplexes bei der Mutante *hcf136* in gleicher Weise ausgeprägt, wie beim Wildtyp. Auch das Ausmaß der Markierung der Untereinheiten Cytochrom b_6 und PetD zeigt keinen Unterschied zum Wildtyp.

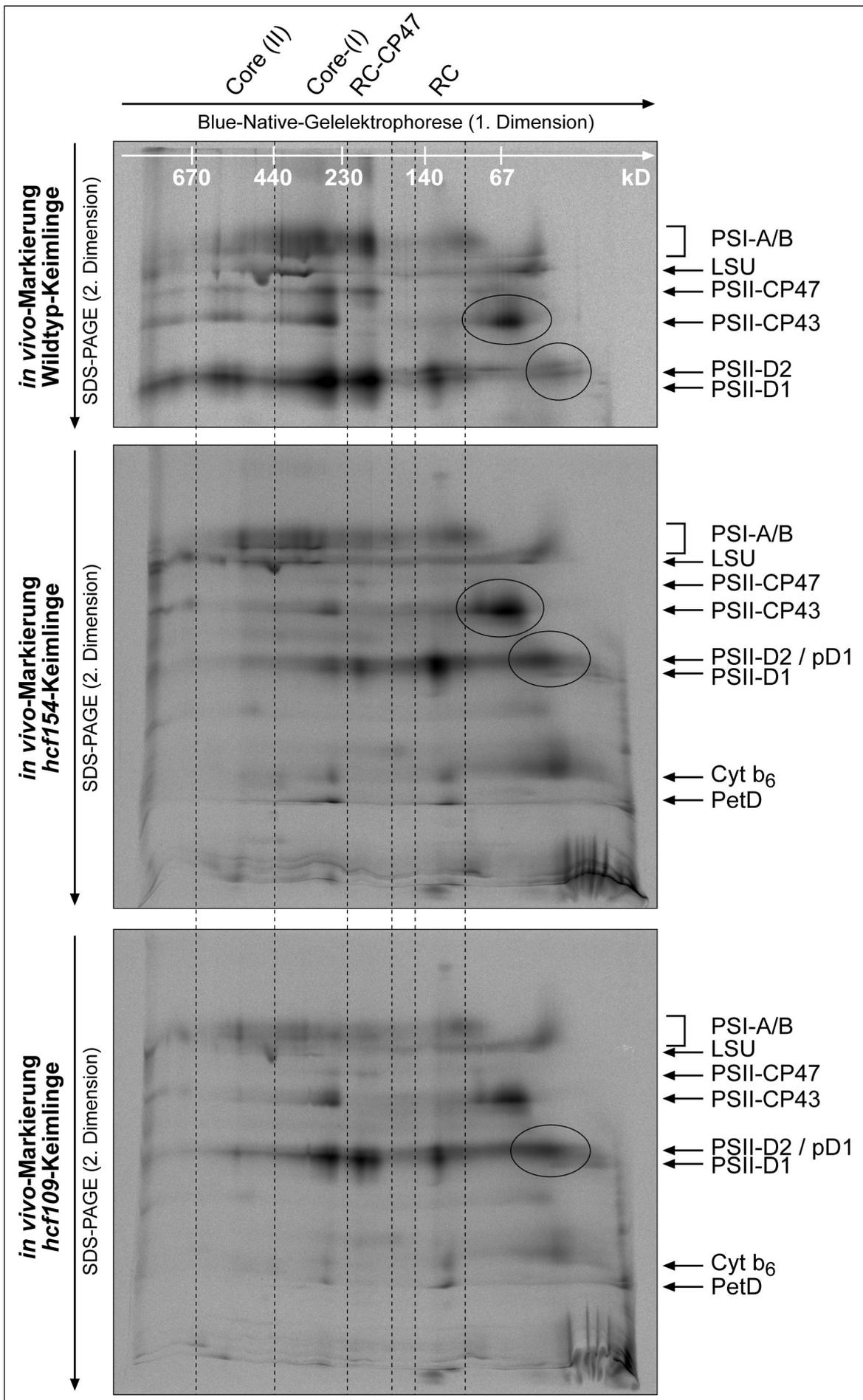
Demgegenüber deckt die native Auftrennung der Thylakoidkomplexe aus den *in vivo* markierten *hcf136*-Keimlingen eine deutliche Hemmung in der Assemblierung des Photosystems II auf. Die typischen Assemblierungsintermediate des Photosystems II fehlen in dieser Mutante bzw. sind nur in ganz geringen Restmengen nachweisbar. Interessanterweise kann in der Mutante schon der Subkomplex des PS II-Reaktionszentrums aus D1, D2 und Cytochrom b_{559} nicht mehr nachgewiesen werden. Es zeigt sich allerdings, daß die neusynthetisierten monomeren Formen von D2 und CP43, aber auch jene von CP47 und der LSU deutlich stärker als beim Wildtyp akkumulieren. Dies läßt auf hohe Translationsraten schließen. Die prozessierte Form des D1-Proteins ist in der Mutante nicht zu erkennen. Vermutlich liegt D1 als unprozessiertes pD1 vor, das auf fast gleicher Höhe wie das D2-Protein bandiert. Die starke Akkumulation des 23kD-Abbauproduktes des D1-Proteins in der Mutante läßt zumindest auf eine hohe D1-Syntheserate einerseits und einen hohen D1-Abbau andererseits schließen. Insgesamt werden die Untereinheiten des PS II-Kernkomplexes in hohen Raten synthetisiert. Der Zusammenbau hingegen findet nicht bzw. nur in geringen Restmengen statt, wobei schon der erste Assemblierungsschritt zum Reaktionszentrum gehemmt wird.

Die Frage war nun, ob die Hemmung der Assemblierung des PS II-Reaktionszentrums spezifisch für die Mutante *hcf136* ist oder ob sie allgemein bei *hcf*-Mutanten vorliegt, die primär in der Biogenese des Photosystems II betroffen sind. Dazu wurden Blue-Native/2D-Auftrennungen von Thylakoiden der beiden PS II-Mutanten *hcf154* und *hcf109* durchgeführt, welche zuvor der *in vivo*-Markierung in Gegenwart von Cycloheximid unterzogen worden waren. Abb. 31 zeigt die Autoradiographien dieser Auftrennungen. Die Mutante *hcf154* ist in der Reduktion der Proteinspiegel der PS II-Untereinheiten und im Chlorophyll a -Gehalt der Mutante *hcf136* sehr ähnlich (s. Abschnitt 3.5.2). Man kann aber in dieser Mutante eine Assemblierung des Reaktionszentrums beobachten, die genauso effektiv wie im Wildtyp stattfindet. Die weiteren Assemblierungsschritte zum RC-CP47-Komplex bzw. zum PS II-Kernkomplex scheinen dagegen gehemmt zu sein. Die Mutante *hcf154* ist primär in der Translation von PsbH und CP47 betroffen (Felder *et al.*, eingereichtes Manuskript 1999). Insofern stimmt das Assemblierungsmuster der Mutante mit den Erwartungen überein. Da das Reaktionszentrum in dieser Mutante also prinzipiell zusammengebaut wird, scheint die Hemmung dieses ersten Assemblierungsschrittes in der Mutante *hcf136* in der Tat spezifisch zu sein.

Die Mutante *hcf109* hat leicht reduzierte Syntheseraten beim CP47 und möglicherweise auch beim PsbT-Protein (Meurer *et al.*, 1996a). Die Untersuchung des Assemblierungsverhaltens in der EMS-Mutante *hcf109* liefert folgende Ergebnisse: Die Assemblierung bis zum PS II-Kernkomplex findet in ähnlichem Maße wie beim Wildtyp statt. Allerdings scheint die Assemblierung zum dimeren PS II Kernkomplex gestört zu sein, da sie in weitaus geringerem Maße stattfindet wie beim Wildtyp.

Sowohl die Mutante *hcf154* als auch die Mutante *hcf109* sind nicht in der Assemblierung des PS II-Reaktionszentrums betroffen. Dies bestätigt die Vermutung, daß dieser Defekt in der Mutante *hcf136* spezifisch ist und offensichtlich erklärt, warum alle weiteren Assemblierungsschritte des Photosystems II in dieser Mutante ausbleiben.

Abb. 31: Autoradiographien von Blue-Native-2D-Auftrennungen *in vivo*-markierter *Arabidopsis thaliana*-Thylakoide aus Wildtyp-, *hcf154*- und *hcf109*-Keimlingen. Die Autoradiographie des Wildtyp ist um den unteren Bereich verkürzt worden (vgl. Abb. 29). Die Beschriftung erfolgte analog zu der in Abbildung 30.



4 Diskussion

Die posttranslationalen Schritte in der Biogenese der photosynthetischen Komplexe der Thylakoidmembran stehen in den letzten Jahren zunehmend im Blickpunkt des Interesses zahlreicher Untersuchungen (zusammengefaßt in Wollman *et al.*, 1999). Neben allgemeinen Chaperonen und Proteasen scheinen an den finalen Schritten der Entstehung membranintegrativer Proteinkomplexe auch spezifische Faktoren beteiligt zu sein. Die Mutante *hcf136* von *Arabidopsis thaliana* konnte die Existenz eines spezifischen Hilfsfaktors aufdecken, der für die Biogenese des Photosystems II essentiell ist.

Die Mutante *hcf136* ist durch T-DNA-Insertionsmutagenese erzeugt worden. Dank seiner T-DNA-Markierung konnte das in der Mutante ausgeschaltete Kerngen identifiziert und eine zugehörige cDNA isoliert werden (Meurer, 1996; Plücken, 1997). Durch Komplementationsanalysen wurde bewiesen, daß die Mutation des Gens *HCF136* alleine hinreichend für die in der Mutante beschriebene Hemmung der Biogenese des Photosystems II ist.

4.1 Die Evolution des *HCF136*-Gens

Ähnlichkeitssuchen in Sequenz-Datenbanken zeigten, daß das kernkodierte *HCF136*-Gen einen cyanobakteriellen Ursprung hat. Im Cyanobakteriengenom liegt das homologe *ycf48*-Gen direkt stromaufwärts vor dem *psbE*, -F, -L, -J-Cluster und hinter dem *hoxR*-Gen (Rubredoxin) (Kaneko *et al.*, 1996). Außer in der Cyanelle der ursprünglichen Alge *Cyanophora paradoxa* (Stirewaldt *et al.*, 1995) konnten *ycf48*-Homologe in keinem der bisher sequenzierten Plastome der Grün-, Rot- und Braunalgen bzw. der höheren Pflanzen nachgewiesen werden (Sugiura, 1992; Hallick *et al.*, 1993; Kowallik *et al.*, 1995; Reith & Munholland, 1995; Wakasugi *et al.*, 1997; Douglas & Penny 1999). Die Cyanellen-tragenden Glaucocystophyceen gliederten sich in der Algenentwicklung vermutlich ab, bevor die Aufspaltung in die beiden chlorophytischen und rhodophytischen / chromophytischen Linien erfolgte (Kowallik, 1993; Douglas *et al.*, 1994; Helmchen *et al.*, 1995; Douglas, 1998; Gray *et al.*, 1999; Moreira *et al.*, 2000). Insofern scheint der Transfer des ursprünglich cyanobakteriellen Gens *HCF136* in den Kern innerhalb der Algenentwicklung ebenfalls bereits vor der Aufspaltung der beiden Linien stattgefunden zu haben oder er hat sich mehrfach unabhängig voneinander im Laufe der Evolution ereignet. Bei *Guillardia theta*, einer *Cryptophyceae* mit sekundärer Endosymbiose, wurde ein *ycf48*-Gen im Nukleomorph gefunden (Douglas & Penny, 1999; Maier *et al.*, 2000).

Aufgrund des Gentransfers in den Kern muß das *HCF136*-Protein nach seiner Synthese im Cytosol in die Plastide reimportiert werden, um seine Funktion bei der Biogenese des Photosystems II wahrzunehmen. Hierzu wurde *HCF136* bei höheren Pflanzen mit einer aminoterminalen Erweiterung ausgestattet, die das Protein für den Import in die Plastide markiert.

4.2 Das *HCF136*-Protein ist ein peripheres Membranprotein, das auf der luminalen Seite der Stromathylakoide lokalisiert ist

Das *HCF136*-Protein erweist sich – wie auch die homologen *Ycf48*-Proteine - in Hydrophathie-Berechnungen als durchgehend hydrophiles Protein, das nur am Aminoterminus einen ausgeprägteren hydrophoben Abschnitt aufweist. Dieser reicht von der Länge her nicht zur

Bildung α -helikaler, membrandurchspannender Strukturen aus. Die immunologische Lokalisation von HCF136 in Chloroplasten- bzw. Thylakoidsubfraktionen steht im Einklang mit dieser rechnerischen Vorhersage. Das HCF136-Protein liegt als peripheres Thylakoidmembranprotein vor, das durch Salzwäsche von der Thylakoidmembran abgelöst werden kann. Proteolyse-Experimente mit intakten und beschallten Thylakoiden zeigen, daß das HCF136-Protein auf der luminalen Seite der Thylakoidmembran gebunden ist.

Durch Immunolokalisationsexperimente mit Thylakoidsubfraktionen konnte ferner gezeigt werden, daß das HCF136-Protein in den Stromathylakoiden bzw. in den Grana-Randbereichen zu finden ist. Funktionsfähige Photosystem II-Komplexe liegen dagegen überwiegend in Granakernpartikeln vor (Anderson 1986; Guenther & Melis, 1990; Melis, 1991; Anderson, 1992). HCF136 kann also nicht Bestandteil fertiger PS II-Komplexe sein. Andererseits werden die Photosystem II-Kernkomplexe in den exponierten Stromathylakoiden assembliert (Aro *et al.*, 1993; Kettunen *et al.*, 1996; van Wijk *et al.*, 1996) und anschließend zur Funktionsausübung in die gestapelten Granabereiche transportiert. HCF136 ist also dort lokalisiert, wo die Assemblierung des PS II stattfindet. Damit wird seine Funktion als Hilfsfaktor bei der Assemblierung des PS II-Kernkomplexes wahrscheinlich.

4.3 Hinweise für einen evolutionären Wechsel des Importweges von HCF136 in das Thylakoidlumen

Viele plastidäre Proteine haben ihren Wirkort im Thylakoidlumen. Der Transport dieser Proteine vom Stroma über die Thylakoidmembran in das Lumen verläuft über zwei Hauptwege (Keegstra & Cline, 1999). Der Sec-Weg zeigt Ähnlichkeit zum bakteriellen Exportsystem, bestehend aus den Hauptkomponenten SecA, SecE, SecG und SecY (Dalbey & Robinson, 1999). SecA besitzt ATPase-Aktivität und besitzt eine Art Rezeptorfunktion, d.h. es vermittelt die Interaktion mit den Vorstufenproteinen. SecE, SecG und SecY bilden dagegen einen heterotrimeren Membrankomplex, der eine Translokationspore bildet (Economou, 1998). In Plastiden konnten bisher homologe Faktoren zu SecA, SecE und SecY nachgewiesen werden (Dalbey & Robinson, 1999; Keegstra & Cline, 1999). Ein zweiter Transportweg in das Thylakoidlumen arbeitet unabhängig von ATP, benötigt dafür aber einen Δ pH-Gradienten an der Thylakoidmembran (Robinson *et al.*, 1998). Der genaue Mechanismus dieses sogenannten Tat-Weges ist noch nicht geklärt. Seine Bedeutung in Plastiden wurde durch drastische Defekte bei der Biogenese der Thylakoidmembrankomplexe in den Mutanten *hcf106* und *tha4* von Mais aufgedeckt (Voelker & Barkan, 1995; Walker *et al.*, 1999). Auch der Tat-Translokationsmechanismus ist evolutionär konserviert, da entsprechende Komponenten in Eubakterien gleichermaßen nachgewiesen werden können (Berks *et al.*, 2000). Die Substrate der Tat-Translokase sind Proteine mit Transitsequenzen, die vor der hydrophoben H-Domäne ein charakteristisches Zwillingsarginin-Motiv enthalten (Henry *et al.*, 1997; Mori & Cline, 1998). Das 34 kD-Protein des PS II und das Plastocyanin werden über den ATP-abhängigen Sec-Weg in das Thylakoidlumen importiert, wohingegen die Proteine PSII-23kD, PSII-16kD, PsbT und PsaN typische Substrate des Δ pH-abhängigen Transportweges darstellen (Robinson *et al.*, 1998). Diese vier Proteine kommen interessanterweise in Cyanobakterien nicht vor.

Durch Importexperimente von *in vitro* synthetisiertem HCF136-Vorläuferprotein in Erbse-Chloroplasten konnte gezeigt werden, daß HCF136 bei höheren Pflanzen ausschließlich über den Δ pH-Weg in das Thylakoidlumen importiert wird. Außerdem wurde experimentell bestätigt,

daß das Zwillingsarginin-Motiv bei Position 56/57 der Transitsequenz dabei absolut notwendig für diesen Mechanismus des Imports ist (Hynds *et al.*, 2000). Interessanterweise besitzen die homologen Ycf48-Proteine in den Cyanobakterien *Synechocystis* und *Anabaena* und in der Cyanelle der ursprünglichen Alge *Cyanophora* dieses Zwillingsarginin nicht. Nach bisherigem Kenntnisstand ist dieses Motiv aber für den Transport über den Tat-Weg in das Thylakoidlumen bei Plastiden zwingend erforderlich (Chaddock *et al.*, 1995; Mori & Cline, 1998). Bei Eubakterien konnte in Einzelfällen ein Arginin durch ein Lysin ersetzt werden, ohne daß der Transport eines Tat-Substrates vollständig gestört wurde (Stanley *et al.*, 2000). Der Austausch beider Argininreste führte dagegen zur vollständigen Hemmung des Tat-Importweges. Da die Ycf48-Transitsequenzen bei *Synechocystis* und *Anabaena* an entsprechender Position vor der H-Domäne weder ein "RR", noch ein "RK"-Motiv enthalten (Abb. 5), scheint der Importweg des Proteins bei Cyanobakterien über den ATP-abhängigen Sec-Weg abzulaufen, was allerdings bisher experimentell nicht bewiesen wurde.

Es wurde bisher vermutet, daß beim Transfer eines Gens in das Kerngenom die Lumentransitsequenz des zugehörigen Proteins erhalten bleibt und lediglich durch eine zusätzliche Stromatransitsequenz ergänzt wird, wie es auch beim 34 kD-Protein des PS II der Fall ist. HCF136 ist das erste Beispiel eines kernkodierten luminalen Proteins, dessen Importweg bei höheren Pflanzen diesem Modell widerspricht. Vielmehr scheint die Anpassung des Importmechanismus an den Gentransfer komplexer zu sein, als man bisher angenommen hat. Da HCF136 bei höheren Pflanzen im *in vitro*-Experiment nicht mehr über den Sec-Weg in das Lumen der Thylakoide importiert werden kann, hat offensichtlich ein Wechsel des Importweges stattgefunden. Die Frage ist nun, warum dieser Wechsel zustande kam. Das HCF136-Protein wird bei höheren Pflanzen im Cytosol translatiert. Daraufhin folgt der Import in das Stroma der Plastide und schließlich der Transfer in das Thylakoidlumen. Das Ycf48-Protein von *Synechocystis* hingegen kann direkt nach seiner Synthese im Stroma in das Lumen importiert werden und dort seine Aufgabe wahrnehmen. Damit bleibt dem HCF136-Protein bei höheren Pflanzen wesentlich mehr Zeit zur Verfügung, in der bereits eine teilweise oder sogar komplette und feste Faltung erfolgen kann. Nun hat sich gezeigt, daß der bakterielle Sec-Weg nicht in der Lage ist, größere Mengen an sekretorischen Proteinen zu exportieren, was vermutlich auf eine Faltung dieser Proteine vor dem Export zurückzuführen ist (Wickner *et al.*, 1991; Simonen & Palva, 1993). Die Tat-Translokase scheint dagegen nicht auf ungefaltene Proteine limitiert zu sein (Berks, 1996; Clark & Theg, 1997; Hynds *et al.*, 1998). Möglicherweise war also der Wechsel des Lumenimportweges vom Sec-Weg zum Tat-Weg notwendig, da HCF136 bei höheren Pflanzen aufgrund der Synthese des Proteins im Cytosol mehr Zeit zur Faltung zur Verfügung gestellt bekommt. Damit bestünde eine direkte Korrelation zwischen dem Transfer dieses Gens in den Kern und der Notwendigkeit eines Wechsels im Lumenimportmechanismus.

Bei *Guillardia theta* wurde ein ycf48-Gen im Nukleomorph gefunden (Maier *et al.*, 2000). Daher würde man erwarten, daß das Ycf48-Protein hier ebenfalls über den Tat-Weg in das Thylakoidlumen importiert wird. Die Transitsequenz des Ycf48-Proteins von *Guillardia theta* zeigt jedoch kein Zwillingsarginin-Motiv unmittelbar vor der H-Domäne (Abb. 5). Statt dessen liegt hier ein "RT"-Motiv vor, das den Tat-Weg nach bisherigen Kenntnissen ausschließen sollte. Nun sind allerdings zwei Aspekte bei diesem Ergebnis zu bedenken: Zum einen stammt die vorliegende Sequenzinformation aus der Analyse eines PCR-Produktes (Prof. UG Maier, pers. Mitteilung), wodurch einzelne Fehler in der Sequenz denkbar sind. Die nahe Codon-

Verwandschaft von Threonin (ACA) und Arginin (AGA) macht dies sogar wahrscheinlich. Zum anderen ist bisher nur die Existenz eines nukleomorph-kodierten *ycf48*-Gens in *Guillardia* nachgewiesen worden. Untersuchungen zur Expression dieses Gens bzw. zum Import in die Plastide stehen dagegen noch aus (Prof. UG Maier, pers. Mitteilung). Es ist durchaus denkbar, daß im eigentlichen Kern dieser Algen eine weitere, funktionelle Kopie des *ycf48*-Gens existiert, möglicherweise sogar mit Zwillingsarginin-Motiv in der Transitsequenz. Auch dazu gibt es bisher noch keine Informationen. Es wäre wünschenswert, weitere HCF136-Sequenzen aus unterschiedlichen Algengruppen, Moosen und höheren Pflanzen zur Verfügung zu haben, um bei den kernkodierten Genen die Existenz des Zwillingsarginin-Motivs im Transitpeptid zu überprüfen. Bislang stehen jedoch nur EST-Sequenzen aus höheren Pflanzen, dem Moos *Physcomitrella patens* sowie der Braunalge *Laminaria digitata* zur Verfügung, die leider alle keinen vollständigen 5'-Bereich aufweisen und somit bei der Problemstellung nicht weiterhelfen.

4.4 Das HCF136-Protein ist ein essentieller und spezifischer Faktor für die Biogenese des Photosystems II höherer Pflanzen

Die Mutante *hcf136* von *Arabidopsis thaliana* zeigt einen drastischen Defekt in der Biogenese des Photosystems II, der durch immunologische Untersuchungen und spektroskopische Messungen nachgewiesen wurde (Meurer, 1996). Dabei sind alle Untereinheiten des Photosystem II-Kernkomplexes (D1, D2, CP47, CP43, Cytochrom b_{559}) sowie die kernkodierten Untereinheiten 34kD und 23kD im Vergleich zum Wildtyp erheblich reduziert. Die Immunoblot-Untersuchungen zeigten außerdem, daß das Photosystem I unter Normallicht auf unter 25% des Wildtyps reduziert ist. Eine Reduktion im Cytochrom b_6f -Komplex bzw. in der ATP-Synthase konnte dagegen nicht beobachtet werden. Die Reduktion des Photosystems I ist eine allgemeine Beobachtung bei Mutanten des Photosystems II und des Cytochrom b_6f -Komplexes. In dieser Arbeit wurde eine vergleichende Analyse von Photosystem II-, Photosystem I- und Cytochrom b_6f -Mutanten unter Schwachlicht und Normallicht durchgeführt, um die primäre Auswirkung der Mutation besser zu erkennen. Die Mutante *hcf136* zeigt dabei wie auch die beiden Vergleichsmutanten *hcf173* und *hcf154* bereits unter sehr schwachen Lichtstärken einen drastischen Defekt in der Biogenese des Photosystems II. Die Akkumulation des Photosystems I erreicht unter diesen Bedingungen hingegen noch rund 50-75 % des Wildtyp-Niveaus. Erst unter Normallicht sind die PS I-Proteinspiegel deutlich reduziert (12,5-25% des Wildtyps). Auf diese Weise konnte gezeigt werden, daß die Reduktion des Photosystems I ein sekundärer Effekt der Mutation ist.

Die Mutanten *hcf173* und *hcf154* sind auf der Ebene der RNA-Stabilität betroffen, was zur Hemmung der Translation einzelner PS II-Untereinheiten führt. Die Folge ist, daß alle Untereinheiten des Kernkomplexes nicht akkumulieren können, weil eine stabilisierende Komplex-Assemblierung ausbleibt. Bei der Mutante *hcf136* findet die Synthese der Kernkomplex-Untereinheiten des PS II prinzipiell statt (Meurer, 1996). Dennoch ist hier ebenfalls keine stabile Akkumulation erkennbar. Dieses Ergebnis spricht für einen Defekt auf posttranslationaler Ebene. Die Tatsache, daß die Mutante *hcf136* schon bei Anzucht unter sehr schwachen Lichtbedingungen einen so drastischen Photosystem II-Phänotyp zeigt, macht außerdem einen Stabilitätsverlust des Photosystems II in der Mutante als primäre Mutationsauswirkung unwahrscheinlich. Ein Verlust der Stabilität sollte sich nämlich erst unter Normallicht deutlich auswirken, wie man es beim Photosystem I beobachtet. Vielmehr deutet dieses Ergebnis auf einen Assemblierungsdefekt des Photosystems II hin und steht im Einklang

mit der Lokalisation des HCF136-Proteins in den exponierten Stromabereichen der Thylakoidmembran.

4.5 Die preferentielle Expression von HCF136 in Mesophyll-Chloroplasten von malatbildenden C4-Pflanzen unterstützt den funktionellen Zusammenhang mit dem Photosystem II

Die Stöchiometrie des Photosystems II zu den anderen Proteinkomplexen der Thylakoidmembran variiert in Abhängigkeit von den Lichtbedingungen (Melis, 1991). Die Tatsache, daß die Photosystem II-Biogenese unabhängig von den übrigen Thylakoidmembran-Komplexen reguliert werden kann, zeigen die Untersuchungen zur differentiellen Akkumulation der Photosystem II-Untereinheiten in Mesophyll- und Bündelscheidenzellen von C4-Pflanzen des NADP-Malatenzym-Typs (Schuster *et al.*, 1985; Oswald *et al.*, 1990). Das Photosystem II wird preferentiell in Mesophyll-Chloroplasten akkumuliert (Westhoff *et al.*, 1990, 1991). Dies steht in einem engen funktionellen Zusammenhang mit der zellulären Arbeitsteilung bei der C4-Photosynthese (Woo *et al.*, 1970; Bassi *et al.*, 1995).

Das HCF136-Protein wird in den Chloroplasten der Bündelscheidenzellen der C4-Pflanzen Mais und *Sorghum* deutlich schwächer akkumuliert als in den Chloroplasten der Mesophyllzellen. Dies gilt insbesondere für *Sorghum bicolor*, wo die Akkumulation in den Bündelscheiden-Chloroplasten unterhalb von 25% des Niveaus bei Mesophyll-Chloroplasten liegt. Es zeigt sich allerdings, daß repräsentative Untereinheiten des Photosystems II in stärkerem Ausmaße in den Bündelscheiden-Chloroplasten bei Mais und *Sorghum* reduziert sind als es für HCF136 der Fall ist. Trotzdem unterstützt die präferentielle Expression von HCF136 in den Mesophyll-Chloroplasten dessen funktionellen Zusammenhang mit dem Photosystem II.

Da die Reduktion der PS II-Proteinspiegel in den Bündelscheiden-Chloroplasten insbesondere auf verminderte mRNA-Stabilität bzw. auf verminderte Transkriptionsaktivität zurückzuführen ist (Meierhoff & Westhoff, 1993; Kubicki *et al.*, 1994), kann das HCF136-Protein nicht als primäre Ursache für die differentielle Genexpression der PS II-Untereinheiten herangezogen werden, denn seine Wirkung erfolgt erst posttranslational. Dennoch ist damit nicht ausgeschlossen, daß HCF136 durch seine Wirkung auf die Photosystem II-Biogenese auf der posttranslationalen Ebene zur differentiellen Ausprägung von PS II-Proteinspiegeln in den Mesophyll- und Bündelscheidenzellen beiträgt. Das bedeutet, daß die Verminderung der PS II-Spiegel in den Bündelscheiden möglicherweise zu einem gewissen Anteil auf die verminderte Akkumulation des HCF136-Proteins zurückzuführen ist.

4.6 Gibt es eine Kopplung zwischen der HCF136-Expression und der Chlorophyll a-Akkumulation ?

Die Analyse der photosynthetischen Pigmente in Keimlingen der Mutanten *hcf136*, *hcf173*, *hcf154* und *hcf145* im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen zeigt, daß in den Mutanten parallel zur Reduktion der Photosystem II- und Photosystem I -Untereinheiten eine deutliche Verminderung in der Chlorophyll a- und β -Carotin-Akkumulation gemessen werden kann. Insbesondere die Chlorophyll a-Akkumulation scheint mit den Apoproteinspiegeln eng gekoppelt zu sein. Der Chlorophyllsynthese-Apparat der Plastide ist so konzipiert, daß die Entstehung von freien Chlorophyllen möglichst vermieden wird, da dies zu photooxidativen Schäden führen kann. Man nimmt an, daß die direkte Vorstufe des Chlorophylls, das Chlorophyllid, seine eigene Synthese

durch negative Rückkopplung hemmt (Reinbothe & Reinbothe, 1996; Averina, 1998). Es ist auffällig, daß die Mutante *hcf136* die deutlichste Reduktion in der Chlorophyll a-Akkumulation bei Normallicht aufweist. Beim Vergleich der Werte im Schwachlicht und im Normallicht zeigt sich bei *hcf136* ganz im Gegensatz zum Wildtyp bzw. zu der ansonsten ähnlich stark in der Biogenese des Photosystems II betroffenen Mutante *hcf154* sogar ein Rückgang in der Chlorophyll a-Anhäufung.

Parallel zur deutlichen Chlorophyll a-Reduktion erkennt man bei den Mutanten *hcf173*, *hcf154* und *hcf145* auch eine angepaßte Reduktion in der Anhäufung von Chlorophyllid a. Dies ist entsprechend der negativen Rückkopplung bei der Chlorophyll-Synthese auch zu erwarten. Das Verhältnis von Chlorophyllid a zu Chlorophyll a ist daher in diesen Mutanten nicht wesentlich anders als im Wildtyp (Abb. 15). Die Mutante *hcf136* hingegen fällt in der Pigmentakkumulation unter Normallicht-Bedingungen auf. Chlorophyllid a ist hier im Normallicht kaum reduziert, obwohl man dies bei der so starken Chlorophyll a-Reduktion aufgrund des Vergleiches mit den anderen PS II-Mutanten erwarten würde. Die Folge ist ein auffälliges hohes Verhältnis von Chlorophyllid a zu Chlorophyll a in der Mutante *hcf136*, das mit den bisherigen Vorstellungen zur Kontrolle der Chlorophyllbiosynthese im Widerspruch steht.

Wenn man auf der anderen Seite HCF136-Überexpressionslinien untersucht, so kann man eine höhere Chlorophyll a-Akkumulation während der Ergrünungsphase beobachten. Um diese zeitlich aufzulösen, wurden *Arabidopsis*-Keimlinge etiiert und in den ersten 48 h der anschließenden Belichtungsphase analysiert. Das HCF136-Protein wird in den Überexpressionslinien konstitutiv überexprimiert, so daß schon im Dunkeln deutlich höhere Mengen zur Verfügung stehen als in den Wildtyp-Pflanzen. Bei diesem Experiment konnte gezeigt werden, daß zwei Linien mit HCF136-Überexpression eine signifikant höhere Chlorophyll a-Akkumulation zeigen als die beiden Wildtyp-Ökotypen *Columbia* und *Wassilewskija*. Die Überexpressionslinien zeigen darüber hinaus zwei- bis dreimal so große Blattflächen wie die Wildtyp-Linien und in der Immunoblot-Analyse erkennt man bei Normierung auf gleiche Proteinmengen die Tendenz zu leicht höheren Spiegeln an PS II-Kernkomplex-Untereinheiten, wohingegen das PS I-Reaktionszentrum gleich hoch oder sogar schwächer als in den Wildtyp-Linien akkumuliert wird. Insgesamt scheint die PS II-Biogenese in den Überexpressionslinien durch die konstitutive HCF136-Überexpression in der Ergrünungsphase etiiert Keimlinge beschleunigt zu werden, möglicherweise auf Kosten der PS I-Biogenese.

Dies ist folgendermaßen zu erklären: Während der Ergrünungsphase konkurrieren die beiden Photosysteme um neu synthetisiertes Chlorophyll a. Sollte die Photosystem II-Biogenese durch einen schnelleren Chlorophyll a-Einbau infolge der HCF136-Überexpression begünstigt werden, so wird die Photosystem I-Biogenese zumindest in der Ergrünungsphase verlangsamt. In das PS II-Reaktionszentrum werden nur 4-6 Chlorophyll a-Pigmente eingebaut (Zheleva *et al.* 1996; Rhee *et al.*, 1997; Rhee *et al.*, 1998; Barber & Kühlbrandt, 1999). In die inneren Antennen CP47 und CP43 hingegen werden jeweils mindestens 14 Chlorophyll a-Moleküle inseriert (Barber & Kühlbrandt, 1999; Barber *et al.*, 2000). Der Großteil der Chlorophyll a-Pigmente des Photosystem II-Kernkomplexes liegt also in den inneren Antennen. Zu welchem Zeitpunkt die Chlorophyll a-Beladung der inneren Antennen CP47 und CP43 erfolgt, d.h. ob vor oder nach der Assemblierung, ist noch nicht endgültig geklärt. Vermutlich findet bei allen Untereinheiten des Photosystem II-Kernkomplexes eine kotranslationale Chlorophyll-Einbindung statt. Zumindest konnte bei Chlorophyll a-Mangel eine Verlangsamung der Translationselongation des D1-Proteins in Gerste-Plastiden beobachtet werden (Kim *et al.*, 1994b). Beim D1-Protein

kann darüber hinaus eine enge kinetische Kopplung der Translation und der Assemblierung an D2 beschrieben werden (Zhang *et al.*, 1999). Insofern kann eine Assemblierungsunterstützung durch Überexpression eines Hilfsfaktors indirekt für eine schnellere Chlorophyll *a*-Akkumulation in der Ergrünungsphase sorgen. Beim Ausfall des Hilfsfaktors in der Mutante *hcf136* dagegen sieht man umgekehrt einen drastischen Rückgang in der Chlorophyll *a*-Akkumulation, aber eine im Verhältnis dazu außergewöhnlich hohe Anhäufung der direkten Biosynthesevorstufe. Insgesamt scheint es also eine direkte oder indirekte Kopplung zwischen der HCF136-Expression und der Chlorophyll *a*-Anhäufung zu geben.

4.7 Die Überexpression von HCF136 führt in *Arabidopsis thaliana* bei Lichtstreß nicht zum Schutz vor Photoinhibition

Das Photosystem II zeigt eine hohe Sensitivität gegenüber Lichtschädigung, wobei in erster Linie das D1-Protein Angriffspunkt photooxidativer Prozesse ist (Aro *et al.*, 1993; Kettunen *et al.*, 1996). In einem aufwendigen Prozeß, bei dem PS II-Komplexe deassembliert und neu assembliert werden müssen, wird photoinhibiertes D1-Protein abgebaut und durch neu synthetisiertes ersetzt. (Koivuniemi *et al.* 1995). Bei Lichtstreß läßt sich die Schädigung des PS II sehr leicht über die Chlorophyll-Fluoreszenz messen, die in erster Linie vom PS II emittiert wird (Schreiber, 1986; Schreiber *et al.*, 1986; Vavilin *et al.*, 1998). Bei Lichtschädigung (Photoinhibition) kommt es zu einer verminderten variablen Fluoreszenz bzw. zu einer verminderten Fähigkeit der Fluoreszenzlöschung bei der Verabreichung von aktinischem Licht.

Mehrere experimentelle Ansätze zum Vergleich der Überexpressionslinien und der Wildtyp-Ökotypen in Bezug auf Lichtstreßtoleranz wurden durchgeführt. Die Lichtstreßbedingungen waren so ausgelegt, daß sie zu einer nachhaltigen Schädigung im Photosystem II führten. Über die Chlorophyll-Fluoreszenz-Messungen konnte zwischen Überexpressions- und Wildtyp-Linien kein wesentlicher Unterschied in der Lichtstreßtoleranz beobachtet werden. In den Überexpressionslinien ist das Photosystem II offensichtlich nicht besser vor lichtschädigenden Prozessen geschützt als im Wildtyp. Demnach scheint die HCF136-Überexpression keine erhöhten Schutz des PS II herbeizuführen. Die Untersuchung der Mutante *hcf136* unter Schwachlicht spricht dafür, daß das HCF136-Protein prinzipiell keine Stabilitätsfunktion für das Photosystem II hat, sondern vielmehr einen Assemblierungsfaktor darstellt (siehe 4.4).

Da beim D1-Austausch das komplette PS II deassembliert und in den Stromalamellen wieder assembliert werden muß (Aro *et al.*, 1993; Kettunen *et al.*, 1996, 1997), könnte die Überexpression von HCF136 als möglicher Assemblierungsfaktor dennoch einen Effekt in Bezug auf die Lichtstreßtoleranz ausüben. Dies ist jedoch nicht der Fall. Auch in der mehrstündigen Erholungsphase nach dem Lichtstreß sind die Überexpressionslinien nicht in der Lage, schneller einen voll funktionsfähigen Photosystem II-Pool wieder aufzubauen. Es ist denkbar, daß auch im Wildtyp schon genügende Mengen an HCF136-Protein vorhanden sind, so daß das Protein seine Funktion als möglicher Assemblierungsfaktor hier ebenso erfüllen kann wie in den Überexpressionslinien. Damit wäre aber das HCF136-Protein nicht der begrenzende Faktor bei der Reassemblierung des PS II und somit bei der Lichtstreßtoleranz. Vielmehr scheint es wahrscheinlicher, daß die *de novo*-Synthese des D1-Proteins bzw. der proteolytische Austauschprozeß geschwindigkeitsbestimmend sind, während die gleichzeitige oder anschließende Assemblierung schnell abläuft. So konnte in *Synechocystis* die Überexpression einer D1-Form zu einem Schutz vor Photoinhibition führen (Soitamo *et al.*,

1996). Es ist anzunehmen, daß die Expressionshöhe von HCF136 im Laufe der Evolution so angepaßt wurde, daß das Protein nie zum begrenzenden Faktor wird. Möglicherweise kann daher nur eine kombinierte Überexpression von HCF136 und D1 den gewünschten Effekt einer Lichtstreßtoleranz bewirken.

4.8 Der Nachweis von Assoziationen des HCF136-Proteins mit Photosystem II-Subkomplexen

Bei der nativen Auftrennung solubilisierter Chloroplasten-Thylakoide aus Gerste im Saccharose-Dichtegradienten zeigt ein kleiner Teil des HCF136-Pools eine Verschiebung hin zum höhermolekularen Bereich. Das HCF136-Protein ist bis in Fraktion 5 nachweisbar und somit mit Komplexen bis zu einer Größe von 140 kD assoziiert. In diesem Größenbereich sind PS II-Subkomplexe bis einschließlich des Reaktionszentrums vorzufinden.

Das HCF136-Protein wird bereits in Etioplasten akkumuliert und steht daher schon zum frühestmöglichen Zeitpunkt der Photosystem II-Biogenese zur Verfügung. Bei der Auftrennung von solubilisierten Etioplasten-Prothylakoiden im Saccharose-Dichtegradienten liegt noch der gesamte HCF136-Pool als freies Monomer vor. Wurden die Etioplasten hingegen vor der Solubilisierung kurz belichtet, so zeigt ein Teil des HCF136-Pools bei der anschließenden Auftrennung im Saccharose-Dichtegradienten erneut eine Größenverschiebung. Diese reicht bis zur Fraktion 4, wo sich bei entsprechender Auftrennung von Chloroplasten-Thylakoiden der RC-CP47-Komplex mit einer Mindestgröße von ca. 170 kD befindet. Die Lichtinduzierbarkeit der Verschiebung eines Teils des HCF136-Pools bei der Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation von Etioplasten-Prothylakoiden könnte darauf hindeuten, daß die Assoziation von HCF136 mit PS II-Subkomplexen mit dem Chlorophylleinbau gekoppelt ist. In Etioplasten befindet sich eine große Reserve der Protochlorophyllid-Oxidoreduktase (POR), die bei Belichtung sehr schnell aus angereichertem Protochlorophyllid a durch Reduktion Chlorophyllid a herstellen kann (Griffiths, 1975; Porra & Meisch, 1984; Armstrong *et al.*, 1995). Durch Veresterung mit Geranylgeraniol-Pyrophosphat wird Chlorophyll a geliefert (Rüdiger *et al.*, 1980), das normalerweise direkt in die neu zu assemblierenden Photosystem-Komplexe eingebaut wird (Eichacker *et al.*, 1992). Der Prozeß des Chlorophylleinbaus ist bisher wenig verstanden. Es wird angenommen, daß bei der kotranslationalen Membraninsertion des D1-Proteins in PS II-Reaktionszentren auch die Einbindung der Chlorophyll a-Pigmente erfolgt (Kim *et al.*, 1991, 1994b). Die Beteiligung von Hilfsfaktoren bei diesem Prozeß deutet sich durch die Hemmung der Translationelongation des D1-Proteins in der PS II-Mutante vir-115 aus Gerste an (Kim *et al.*, 1994c). Die Translation des D1-Proteins scheint mit der Assemblierung des Reaktionszentrums gekoppelt zu sein (Zhang *et al.*, 1999). Insofern laufen die Prozesse der Assemblierung des Reaktionszentrums und die Chlorophyll a-Einbindung vermutlich parallel ab. Die hier gezeigte Kopplung zwischen der Assoziation von HCF136 mit PS II-Subkomplexen und der Chlorophyll a-Einbindung unterstützen dieses Modell. Außerdem steht sie im Einklang mit der drastischen Reduktion im Chlorophyll a-Gehalt in der Mutante *hcf136* einerseits und mit der erhöhten Chlorophyll a-Akkumulation in ergrünenden HCF136-Überexpressionslinien andererseits.

Bei den hier beschriebenen Experimenten zeigt prinzipiell nur ein Teil des HCF136-Pools Größenverschiebung in den höhermolekularen Bereich. Dies kann einerseits bedeuten, daß nur ein Teil des Proteins zum jeweiligen Zeitpunkt benötigt wird, so daß der restliche Pool als

Monomer in Reserve bleibt. Andererseits erscheint es wahrscheinlich, daß die Bindung von HCF136 an seine Zielproteine sehr schwach oder sehr kurzzeitig ist. Deshalb führt die für diese Experimente notwendige Solubilisierung mit dem milden Detergenz n-Dodecyl- β -D-maltosid bereits zur Trennung der HCF136-Interaktion. Unterstützt wird diese Bewertung durch das Verteilungsmuster des extrinsischen luminalen PSII-34kD-Proteins im Saccharose-Dichtegradienten solubilisierter Chloroplasten-Thylakoide. Dieses Protein wird ebenfalls durch die Solubilisierungsprozedur größtenteils von den fertigen Kernkomplexen abgelöst.

Ein schwache Assoziation des HCF136-Proteins unterstützt seine Funktion als Assemblierungsfaktor, der nur kurzzeitig interagiert, nicht aber Bestandteil des fertigen Komplexes ist. Bindet HCF136 nämlich von luminaler Seite an PS II-Kernkomplex-Untereinheiten und wäre diese Bindung nicht leicht zu unterbrechen, so könnte keine C-terminale Prozessierung des D1-Proteins erfolgen. Das wiederum würde die Photoassemblierung des Mangan-Clusters unmöglich machen und somit eine funktionelle Assemblierung des PS II verhindern. Insofern muß geradezu gefordert werden, daß HCF136 nur transient mit Komponenten des PS II interagiert.

Um die möglichen Interaktoren von HCF136 zu identifizieren, wurde in ausgewählten Fraktionen des Saccharose-Dichtegradienten eine Ko-Immunopräzipitation durchgeführt. Wäscht man bei dieser Prozedur die Protein A-Sepharose vorsichtig mit detergenzhaltigem Waschpuffer, so werden mögliche Interaktionspartner vom HCF136-Protein komplett abgetrennt. Dies spricht für die zuvor postulierte schwache Interaktion. Verzichtet man hingegen auf Detergenz im Waschpuffer, so werden große Mengen an PS II-Proteinen unspezifisch gebunden, wie sich durch Kontroll-Präzipitation zeigen ließ. Daraus ergibt sich, daß die Ko-Immunopräzipitation nicht geeignet ist, um Interaktionspartner von HCF136 zu ermitteln.

Die Immunoblot-Analyse der Blue-Native/2D-Auftrennung von *Arabidopsis*-Thylakoiden zeigt, daß auch mit dieser Methode wie zuvor bereits beim Saccharose-Dichtegradienten nur ein Teil des HCF136-Pools als höhermolekulare Fraktion identifiziert werden kann. Interessanterweise erkennt man nicht einen distinkten Punkt, der einen konkreten Komplex markieren würde. Vielmehr zeigt diese höhermolekulare Fraktion einen kontinuierlichen Größenbereich, der im Immunoblot bis zu einer Größe von 70 kD reicht. Die Ko-Migration einer D2-Form mit einer höhermolekularen Form von HCF136 deutet auf eine Interaktion dieser beiden Proteine hin, wobei der Komplex in einem Größenbereich von 70 kD liegt. Das Molekulargewicht eines D2-HCF136-Komplexes beträgt ca. 72 kD (34+38 kD) bzw. bei zusätzlicher Anbindung des Cytochrom b_{559} -Heterodimers 86 kD (34+14+38 kD). Insofern unterstützt die Immunoblot-Analyse die Annahme einer solchen Interaktion, kann sie jedoch alleine nicht beweisen. Prinzipiell ist genauso eine Interaktion von HCF136 mit D1 denkbar, was einen Komplex gleicher Größenordnung liefern würde. Der Nachweis des D1-Proteins an gleicher Position ist immunologisch aufgrund der Qualität des zur Verfügung stehenden Antiserums nicht möglich, aber die radioaktive Verteilung des D1-Proteins in der *in vivo*-Markierung der Wildtyp-Keimlinge zeigt, daß auch D1-Intermediate in diesem Bereich komigrieren. Der kontinuierliche Größenbereich des HCF136-Proteins demaskiert möglicherweise mehrere kleine Zwischenintermediate der Assemblierung des PS II-Reaktionszentrums.

In der vorliegenden Immunoblot-Analyse der Blue-Native/2D-Auftrennung können keine HCF136-Komplexe bis zu 170 kD nachgewiesen werden, ganz im Gegensatz zur Immunoblot-Analyse des Saccharose-Dichtegradienten solubilisierter Thylakoidmembranen aus Gerste-

Plastiden. Dies kann einerseits an der größeren Proteinbeladung beim Saccharose-Dichtegradienten und damit einer gesteigerten Nachweisempfindlichkeit liegen. Andererseits ist die doppelte Solubilisierung der Proteinkomplexe mit ϵ -Aminocaprinsäure und n-Dodecyl- β -D-maltosid bei der Blue-Native-Auftrennung möglicherweise auch stringenter, so daß eventuell nur kleinere Komplexe erhalten bleiben können.

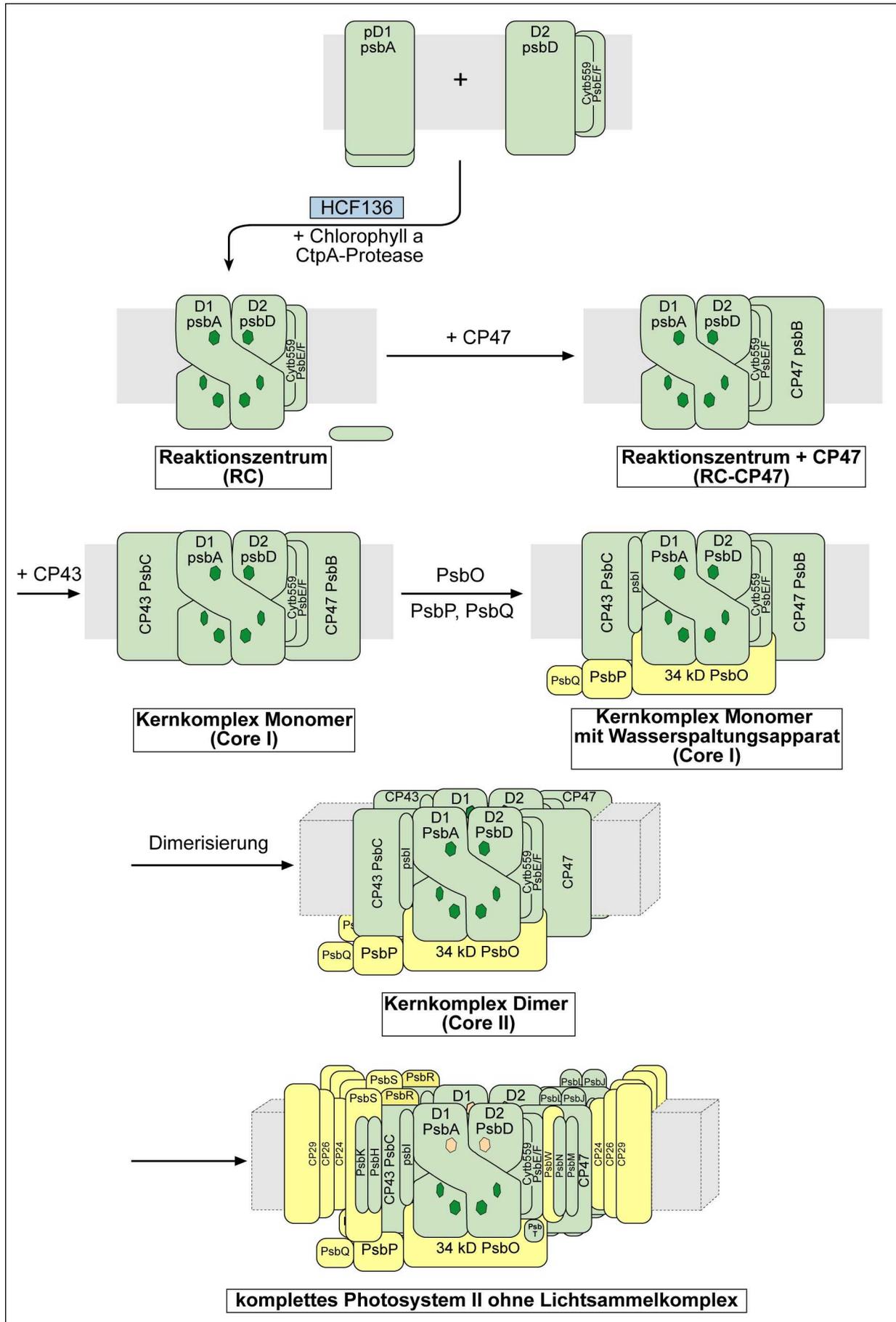
Insgesamt deuten die Ergebnisse der nativen Auftrennungen solubilisierter Thylakoidmembranen sowohl über Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation als auch über native Gelelektrophorese auf eine Assoziation von HCF136 mit PS II-Subkomplexen hin, wobei die Interaktion nur schwach und kurzzeitig zu sein scheint.

4.9 Die Mutante *hcf136* kann das Reaktionszentrum des Photosystems II nicht assemblieren

Die Methode der Blue-Native/2D-Gelelektrophorese kann die verschiedenen Assemblierungsintermediate des Photosystems II deutlich voneinander trennen und ermöglicht ihre Identifizierung (vgl. Abb. 30 oben). Ein Schema der PS II-Assemblierung mit den verschiedenen Subkomplexen ist in Abb. 32 illustriert. Allen bisherigen Kenntnissen zufolge ist der zentrale Ausgangspunkt der Assemblierung des Photosystems II das Reaktionszentrum aus D1, D2 und Cytochrom b_{559} -Heterodimer. Die Auftrennung *in vivo*-markierter *Arabidopsis*-Keimlinge durch Blue-Native/2D-Auftrennung ermöglicht die Untersuchung der Assemblierung *in statu nascendi*. Dabei zeigt sich in eindrucksvoller Weise, daß in der Mutante *hcf136* bereits die Assemblierung des PS II-Reaktionszentrums aus den Untereinheiten D1, D2 und Cytochrom b_{559} ausbleibt. Bei Kontrollmutanten, bei denen einzelne Untereinheiten des PS II nicht synthetisiert werden, kann dagegen eine Assemblierungshemmung erst bei späteren Schritten beobachtet werden (s. Abb. 31). So ist die Mutante *hcf154* prinzipiell in der Lage, das Photosystem II-Reaktionszentrum zu assemblieren, scheitert aber am nächsten Schritt, d.h. an der Anlagerung von CP47. Offensichtlich ist die Hemmung der Assemblierung des Reaktionszentrums spezifisch für die Mutante *hcf136*, was in dieser Arbeit erstmals gezeigt wurde. Die Untereinheiten des PS II-Kernkomplexes pD1, D2, CP47 und CP43 werden in hohem Maße synthetisiert, jedoch in kaum nachweisbaren Mengen assembliert. Gleichzeitig indiziert die hohe Akkumulation des 23kD-Abbauproduktes des D1-Proteins einen hohen D1-"Turnover".

Da schon die Assemblierung des Reaktionszentrums in der Mutante gehemmt wird, kann die Funktion von HCF136 als ein Transportprotein, das PS II-Kernkomplexe nach der Assemblierung zu den Granastapeln befördert, ausgeschlossen werden. Ebenfalls wird dadurch seine Funktion als eine Art "Häm-Lyase" zum Einbau der Häm-Gruppe in das Cytochrom b_{559} -Heterodimer unwahrscheinlich. Zwar konnte in *Synechocystis* gezeigt werden, daß die Hämkoordination in PsbE/F notwendig für die Stabilität des Heterodimers und damit indirekt für den gesamten PS II-Kernkomplex ist (Pakrasi *et al.*, 1989a; Pakrasi *et al.*, 1989b; Pakrasi *et al.*, 1991), jedoch sollte Cytochrom b_{559} nicht notwendig für eine Interaktion der beiden Proteine D1 und D2 sein. Genau diese Interaktion findet aber in der Mutante *hcf136* schon nicht mehr statt.

Abb. 31: Assemblierungsmodell des Photosystems II. Plastidenkodierte Untereinheiten sind grün, kernkodierte gelb gezeichnet. Für das Reaktionszentrum wurden Chlorophyll a-Pigmente (dunkelgrün) bzw. Phäophytin a-Pigmente (orange) eingezeichnet. CtpA: C-terminale Protease für das D1-Protein.



Das D1-Protein liegt in der Mutante hauptsächlich in der unprozessierten Form pD1 vor. Die enzymatische Abspaltung eines Teil des luminalen C-Terminus vom D1-Protein ist notwendig für die Anlagerung des Mangan-Clusters und damit für die Funktionsfähigkeit des Photosystems II. (Bowyer *et al.*, 1992; Anbudurai *et al.*, 1994). Die Abspaltung erfolgt durch die C-terminale Protease (CtpA). Aufgrund der luminalen Lokalisation dieses Enzyms kann eine Beteiligung von HCF136 bei der Prozessierung des D1-Proteins prinzipiell nicht ausgeschlossen werden. So könnte HCF136 beispielsweise die Anbindung der CtpA an pD1 unterstützen oder womöglich den C-Terminus selbst so modifizieren, daß er von der CtpA als Substrat erkannt wird (z.B. durch Phosphorylierung). Jedoch konnte zumindest *in vitro* gezeigt werden, daß die D1-Prozessierung keine Voraussetzung für die Assemblierung des Reaktionszentrums ist (van Wijk *et al.*, 1996) und auch die Akkumulation der Kernkomplex-Untereinheiten in einer entsprechenden CtpA-Nullmutante von *Synechocystis* (Anbudurai *et al.*, 1994) deutet daraufhin, daß dort prinzipiell noch Assemblierung stattfindet. Biochemische Untersuchungen deuten zudem daraufhin, daß die Prozessierung erst nach der Assemblierung des Kernkomplexes stattfindet (Adir *et al.*, 1990). Daher erscheint diese Rolle für HCF136 eher unwahrscheinlich.

Will man das HCF136-Protein als Stabilitätsfaktor für das Photosystem II interpretieren, so muß man annehmen, daß in der Mutante eine PS II-Assemblierung prinzipiell noch stattfindet, aber die Subkomplexe extrem instabil sind und daher sofort wieder abgebaut werden. Die Hemmung der Assemblierung des PS II-Reaktionszentrums ist bei der Mutante *hcf136* jedoch sehr deutlich ausgeprägt. Es ist daher wahrscheinlicher, das HCF136-Protein als Assemblierungs-chaperon zu deuten. Zudem favorisieren die Daten zur Lokalisation des HCF136-Proteins in Stromalamellen und der starke PS II-Defekt bereits bei Anzucht unter Schwachlicht diese Funktion des Proteins. Insofern bewirkt offenbar die Hemmung der PS II-Assemblierung den starken Defekt in der Biogenese des Photosystems II in der Mutante *hcf136*.

4.10 Die Funktion des HCF136-Proteins bei der Biogenese des PS II

Wenn man die in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse zur Charakterisierung der Mutante *hcf136* bzw. der Eigenschaften des durch die Mutante aufgedeckten Proteins zusammenfaßt, so leitet sich für das HCF136-Protein eine essentielle Funktion bei den primären Schritten der PS II-Assemblierung ab. Ein darauf basierendes hypothetisches Modell über die Funktion von HCF136 bei der Assemblierung des PS II-Reaktionszentrum ist in Abb. 33 illustriert. Ausgangspunkt ist Zustand (A), bei dem ein relativ stabiler D2/Cytochrom b_{559} -Subkomplex als Rezeptor für neu zu assemblierendes pD1-Protein dient (Adir *et al.*, 1990). Das HCF136-Protein liegt zunächst als freies Protein vor, das aber sehr wahrscheinlich bereits an die Membran gebunden ist. Eine Bindung von HCF136 mit D2/Cytochrom b_{559} ist aufgrund der Ko-Migration in der Blue-Native/2D-Auftrennung nun denkbar. Dies dürfte mit einer Konformationsänderung von HCF136 einhergehen, wodurch die Rezeptorfunktion von D2 für pD1 verstärkt wird. Das D1-Protein wird nun entweder kotranslational an D2 unter luminaler Mithilfe von HCF136 assembliert (B1, entsprechend Zhang *et al.*, 1999) oder aber unabhängig von D2 kotranslational in die Thylakoidmembran inseriert (B2), wobei dies möglicherweise auch unter Mithilfe von HCF136 geschehen kann. Im Fall von B2 erleichtert HCF136 die Anbindung von fertig synthetisiertem pD1 an D2. In beiden Fällen wirkt HCF136 als Katalysator für die Assemblierung des PS II-Reaktionszentrums.

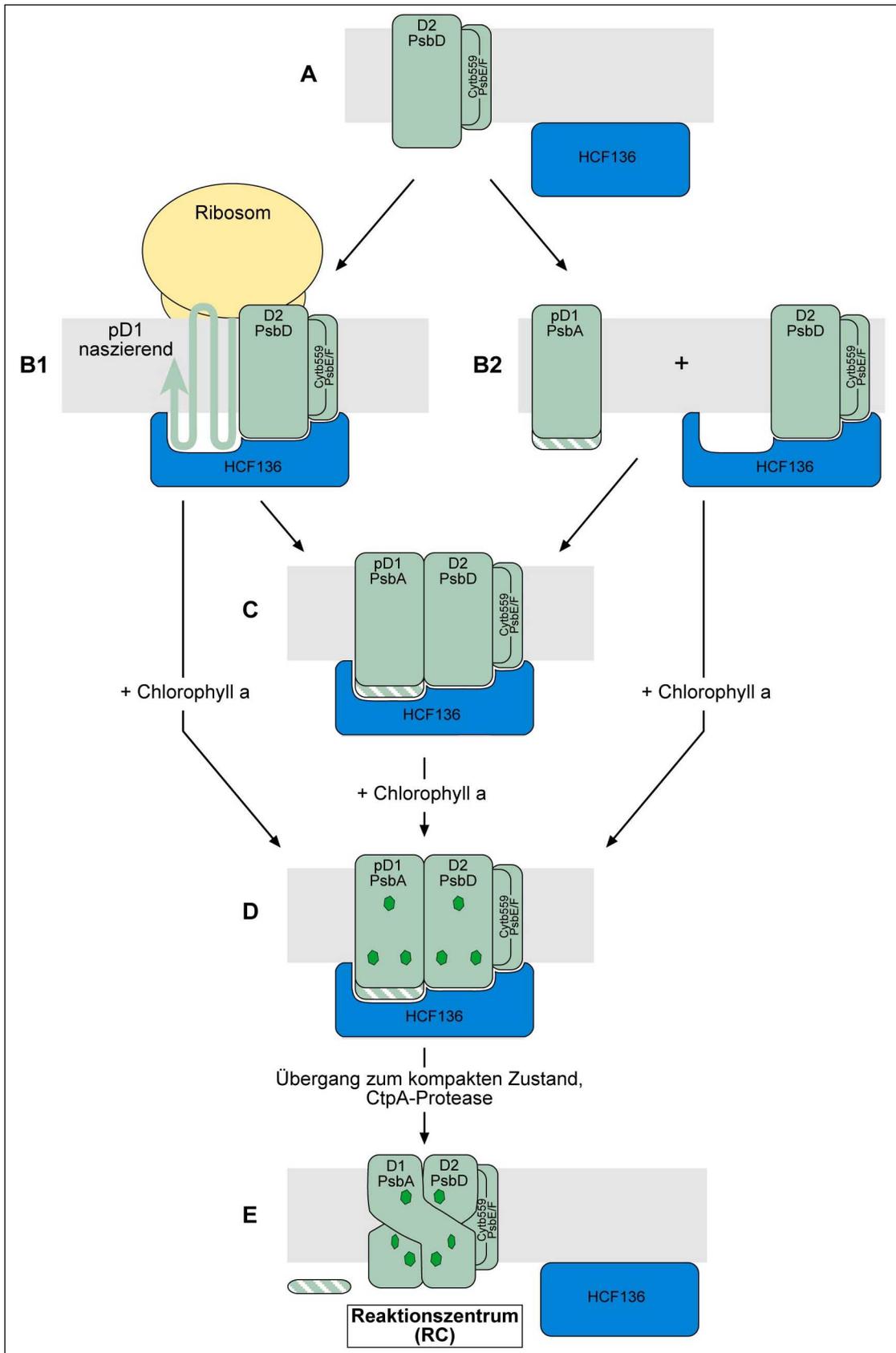


Abb. 33: Hypothetisches Modell für die mögliche Funktion des HCF136-Proteins bei der Assemblierung des Reaktionszentrums des Photosystems II. CtpA: C-terminale Protease für das D1-Protein. Die Zustände A-F sind im Text beschrieben.

Die Lokalisation von HCF136 im Thylakoidlumen hat nun folgenden Vorteil in diesem Modell: Als peripheres Membranprotein auf luminaler Seite behindert es die kotranslationale Assemblierung von pD1-Protein an D2/Cytb₅₅₉ nicht, sondern fördert möglicherweise geradezu das "Zurückfädeln" der naszierenden D1-Proteinkette in die Thylakoidmembran. Im Falle einer von der Assemblierung unabhängigen Synthese von pD1 unterstützt HCF136 eine nachträgliche laterale Zusammenführung der beiden Membranproteine pD1 und D2, ohne die eigentlichen hydrophoben Wechselwirkungen der membrandurch-spannenden α -Helices zu stören. Statt dessen würde durch Erweiterung der Interaktionsfläche auf luminaler Seite diese Interaktion sogar katalysiert. Ein Schutz der Untereinheiten des Reaktionszentrums vor Proteolyse dagegen dürfte entsprechend diesem Modell nicht von HCF136 ausgehen, da der primäre Angriffspunkt der FtsH-Protease am D1-Protein von stromaler Seite her erfolgt (Lindahl *et al.*, 2000). Unabhängig von den beiden Wegen der Assemblierung würde als Endergebnis der Zustand C geliefert, bei dem das Reaktionszentrum zunächst noch in einer offenen, lockeren Konformation vorliegt.

Die Funktion von HCF136 könnte nun auch gerade darin liegen, diese offene Konformation eine gewisse Zeit aufrecht zu erhalten und so den Chlorophyll a-Einbau in das Reaktionszentrum zu fördern. Es gibt aber Hinweise, daß die Chlorophyll a-Einbindung kotranslational mit der D1-Insertion erfolgt (Kim *et al.*, 1991; Kim *et al.*, 1994b) und somit Zustand C übersprungen wird. Das gleiche kann für eine nicht-kotranslationale Assemblierung von pD1 und D2 gelten. Letztlich dürfte aber erst nach der stabilisierenden Insertion der sechs Chlorophyll a-Moleküle (D) von der Membranphase aus das HCF136-Protein das Reaktionszentrum freigeben, das anschließend in eine feste, geschlossene und stabile Konformation (E) übergeht und als Ausgangspunkt für die weiteren Assemblierungsschritte des PS II-Kernkomplexes dient. Durch die C-terminale Protease CtpA wird das pD1-Protein in die prozessierte Form überführt (Shestakov *et al.*, 1994). Vermutlich kann dies auch zu jedem anderen Zeitpunkt dieser Assemblierung stattfinden (van Wijk *et al.*, 1996), ohne daß dies die katalytischen Eigenschaften von HCF136 beeinflussen sollte. Erst nach der Prozessierung kann die Photoassemblierung des Mangan-Clusters erfolgen, bevor sich die luminalen Proteine PSII-34kD, PSII-23kD und PSII-16kD peripher an das D1/D2-Heterodimer anlagern.

In diesem hypothetischen Modell kommen verschiedene Assemblierungsintermediate des HCF136-Proteins vor, die sich im Molekulargewicht unterscheiden. Insofern ist es nachvollziehbar, daß die ganze Bandbreite dieser Assemblierungsintermediate in der Immunoblot-Analyse der Blue-Native/2D-Auftrennung durch einen höhermolekularen "Schmier" des HCF136-Proteins widergespiegelt wird, der bis zur Größe des Reaktionszentrums von knapp unter 140 kD reicht. Hinzu kommen die unterschiedlichen Größen eines möglichen B1-Komplexes, bedingt durch die naszierende D1-Kette. Bei der Auftrennung belichteter (Pro)Thylakoide im Saccharose-Dichtegradienten konnte ein HCF136-Komplex bis in Fraktion 4 nachgewiesen werden, was einem Molekulargewicht von mindestens 170 kD entspricht. Darin könnte der Zustand D enthalten sein, bei dem bereits die zusätzliche Anlagerung von CP47 stattgefunden hat.

Um die dem hier skizzierten Modell zugrunde liegenden Daten im Detail zu erhärten, sind weitere biochemische Untersuchungen sinnvoll. Dabei erweist sich die Methode der nativen Gelelektrophorese als vielversprechend, da sie die niedermolekularen Subkomplexe am besten auflösen kann. Möglicherweise können die biochemische Arbeiten langfristig durch genetische Untersuchungen (z.B. Suppressor-Mutationsanalysen) ergänzt werden.

5 Zusammenfassung

Die posttranslationalen Schritte in der Biogenese der photosynthetischen Komplexe der Thylakoidmembran stehen in den letzten Jahren zunehmend im Blickpunkt des Interesses zahlreicher Untersuchungen. Neben allgemeinen Chaperonen und Proteasen scheinen an den finalen Schritten der Entstehung membranintegrityaler Proteinkomplexe auch spezifische Faktoren beteiligt zu sein. Die Mutante *hcf136* von *Arabidopsis thaliana* hat die Existenz eines spezifischen Hilfsfaktors aufgedeckt, der für die posttranslationale Biogenese des Photosystems II essentiell ist. Mit Hilfe der T-DNA-Insertion konnte das in der Mutante ausgeschaltete Kerngen isoliert und durch Komplementationsanalysen bewiesen werden, daß die Mutation des Gens *HCF136* alleine hinreichend für die in der Mutante beschriebene Hemmung der Biogenese des Photosystems II ist.

Das *HCF136*-Gen ist cyanobakteriellen Ursprungs und wurde im Laufe der Evolution von der Plastide in das Kerngenom transferiert. Zum Import in die Plastide wurde es mit einer Transitsequenz ausgestattet. Immunolokalisationsstudien zeigten, daß HCF136 als peripheres Thylakoidmembranprotein auf der luminalen Seite von Stromathylakoiden lokalisiert ist. Da die Assemblierung der Photosystem II-Untereinheiten ebenfalls in Stromathylakoiden stattfindet, spricht die Lokalisation des HCF136-Proteins für eine Funktion als Hilfsfaktor bei der Assemblierung des PS II-Komplexes.

Der Import des HCF136-Proteins in das Thylakoidlumen erfolgt bei höheren Pflanzen im Gegensatz zu Cyanobakterien über den Δ pH-abhängigen Tat-Weg. Damit ist HCF136 das erste Protein, für das ein Wechsel des Lumenimportweges im Laufe der Evolution beschrieben werden konnte.

Die Untersuchung der Proteinspiegel photosynthetischer Untereinheiten in der Mutante *hcf136* zeigte, daß ein drastischer Defekt in der Biogenese des Photosystems II bereits bei Anzucht unter sehr schwachen Lichtstärken eintritt, was die Funktion des HCF136-Proteins als Stabilitätsfaktor unwahrscheinlich macht. Die ebenfalls beobachtete Reduktion in der Photosystem I-Akkumulation konnte als sekundärer Defekt bestätigt werden, der sich erst im Normallicht deutlich auswirkt. Der funktionelle Zusammenhang des HCF136-Proteins mit dem Photosystem II wird durch die differentielle Akkumulation des Proteins in Mesophyll- und Bündelscheiden-Chloroplasten von malatbildenden C4-Pflanzen unterstützt.

Bei der Auftrennung solubilisierter Thylakoide aus Gerste-Chloroplasten im Saccharose-Dichtegradienten zeigt ein Teil des HCF136-Pools eine Verschiebung in den höhermolekularen Bereich mit einer Größe bis zu 140 kD, wodurch der gesamte Bereich der PS II-Assemblierungsintermediate bis hin zum Reaktionszentrum abgedeckt wird. Das Protein ist schon in Etioplasten nachweisbar, steht also bereits zum frühestmöglichen Zeitpunkt der PS II-Biogenese zur Verfügung. Dort liegt es zunächst ausschließlich als Monomer vor. Durch Lichtinduktion kann allerdings auch hier eine Größenverschiebung bei einem Teil des HCF136-Pools beobachtet werden, der bis zu 170 kD reicht. Dies spricht für eine Kopplung der HCF136-Assoziation an PS II-Subkomplexe mit der Chlorophyll a-Insertion. Die Bindung des HCF136-Proteins mit seinen Bindepartnern ist schwacher Natur und wahrscheinlich nur transient, so daß die Interaktoren nicht mit Hilfe der Ko-Immunopräzipitation aufgereinigt und identifiziert werden

konnten. Bei der Immunoblotanalyse einer nativen Gelelektrophorese von *Arabidopsis*-Thylakoiden deutet eine Komigration des D2-Proteins mit einer höhermolekularen Fraktion von HCF136 bei 70 kD auf eine Interaktion dieser beiden Proteine hin.

Die Auftrennung von Thylakoidproteinen aus *in vivo*-markierten *Arabidopsis*-Keimlingen über Blue-Native / 2D-Gelelektrophorese zeigte, daß in der Mutante *hcf136* die Assemblierung des PS II-Reaktionszentrums aus den Untereinheiten D1, D2 und Cytochrom b_{559} gestört ist, wodurch alle weiteren Assemblierungsschritte gehemmt werden.

Insgesamt läßt sich für das HCF136-Protein eine Funktion als Assemblierungsfaktor für das PS II-Reaktionszentrum ableiten, wobei das Protein wahrscheinlich als luminales peripheres Membranprotein die ko- oder posttranslationale Zusammenführung der Membranproteine D1, D2 und Cytochrom b_{559} in enger kinetischer Kopplung mit der Chlorophyll a -Einbindung katalysiert.

6 Literatur

- Abdallah, F, Salamini, F and Leister, D (2000) A prediction of the size and evolutionary origin of the proteome of chloroplasts of *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci* 5(4):141-142
- Adir, N, Shochat, S and Ohad, I (1990) Light-dependent D1 protein synthesis and translocation is regulated by reaction center II. Reaction center II serves as an acceptor for the D1 precursor. *J Biol Chem* 265(21):12563-12568
- Åkerlund, HE, Jansson, C and Andersson, B (1982) Reconstitution of photosynthetic water splitting in inside-out thylakoid vesicles and identification of a participating polypeptide. *Biochim Biophys Acta* 681: 1-10
- Altschul, SF, Boguski, MS, Gish, W and Wootton, JC (1994) Issues in searching molecular sequence databases. *Nature Genet* 6: 119-129
- Allen, JF, Alexciev, K and Håkansson, G (1995) Photosynthesis: Regulation by redox signalling. *Curr Biol* 5: 869-872
- Almela, L, Fernandez-Lopez, JA and Roca MJ (2000) High performance liquid chromatographic screening of chlorophyll derivatives produced during fruit storage. *J Chromatogr A* 870: 483-489
- Altamura, N, Capitanio, N, Bonnefoy, N, Papa, S and Dujardin, G (1996) The *Saccharomyces cerevisiae* OXA1 gene is required for the correct assembly of cytochrome c oxidase and oligomycin-sensitive ATP synthase. *FEBS Lett* 382: 111-115
- Anbudurai, PR, Mor, TS, Ohad, I, Shestakov, SV, and Pakrasi, HB (1994) The *ctpA* gene encodes the C-terminal processing protease for the D1 protein of the photosystem II reaction center complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 91(17):8082-8086
- Anderson, JM (1986) Photoregulation of the composition, function and structure of thylakoid membranes. *Annu Rev Plant Physiol* 37: 93-136
- Anderson, JM (1992): Cytochrome *b₆f*-complex: Dynamic molecular organization, function and acclimation. *Photosynthesis Res* 34: 341-357.
- Andersson, B and Styring, S (1991) Photosystem II: molecular organization, function, and acclimation. In Lee, CP (ed.), *Current Topics in Bioenergetics*, Vol 16. Academic Press San Diego, pp. 1-81
- Andréasson, LE and Vänngård, T (1988) Electron transport in photosystems I and II. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 39: 379-411
- Appel, RD, Bairoch, A, Hochstrasser, DF (1994) A new generation of information retrieval tools for biologists: the example of the ExpASY WWW server. *Trends Biochem Sci* 19:258-260
- Armstrong, GA, Runge, S, Frick, G, Sperling, U and Apel, K (1995) Identification of NADPH:Protochlorophyllide Oxidoreductases A and B: A Branched Pathway for Light-dependent Chlorophyll Biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 108: 1505-1517
- Arnon, DI (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol* 24: 1-13
- Aro, EM, Virgin, I and Andersson, B (1993) Photoinhibition of Photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. *Biochim Biophys Acta* 1143(2):113-134
- Arlt, H, Tauer, R, Feldmann, H, Neupert, W and Langer, T (1996) The YTA10-12 complex, an AAA protease with chaperone-like activity in the inner membrane of mitochondria. *Cell* 85(6):875-885
- Averina, NG (1998) Mechanisms of regulation and interplastid localization of chlorophyll biosynthesis. *Membr Cell Biol* 12(5):627-643
- Baker, NR and Horton, P (1987) Chlorophyll fluorescence quenching during photoinhibition. In Kyle, DJ, Osmond, CB and Arntzen, CJ, *Photoinhibition*, Elsevier Science Publishers BV, Biomedical Press, Amsterdam, pp. 145-168

- Barber J (1998) Photosystem two. *Biochim Biophys Acta* 1365(1-2):269-277
- Barber, J, Nield, J, Morris, EP, Zheleva, D and Hankamer, B (1997) The structure, function and dynamics of photosystem two. *Physiol Plant* 100: 817-827
- Barber, J, Morris, E and Büchel, C (2000) Revealing the structure of the photosystem II chlorophyll binding proteins CP43 and CP47. *Biochim Biophys Acta - Bioenergetics* 1459(2-3) pp. 239-247
- Barber, J and Kühlbrandt W (1999) Photosystem II. *Current opinion in structural biology* 9: 469-475
- Barkan, A, Miles, D, and Taylor, WC (1986): Chloroplast gene expression in nuclear, photosynthetic mutants of maize. *EMBO J* 5: 1421-1427
- Barkan, A, Walker, M, Nolasco, M and Johnson, D (1994) A nuclear mutation in maize blocks the processing and translation of several chloroplast mRNAs and provides evidence for the differential translation of alternative mRNA forms. *EMBO J* 13(13):3170-3181
- Bassi, R, Marquardt, J, and Lavergne, J (1995) Biochemical and functional properties of photosystem II in agranal membranes from maize mesophyll and bundle sheath chloroplasts. *Eur J Biochem* 233(3):709-19
- Berks, BC (1996) A common export pathway for proteins binding complex redox cofactors? *Mol Microbiol.* 22(3):393-404
- Berks, BC, Sargent, F, De Leeuw, E, Hinsley, AP, Stanley, NR, Jack, RL, Buchanan, G and Palmer, T (2000) The Tat protein export pathway. *Mol Microbiol.* 35(2):260-74
- Birnboim, HC and Doly, J (1979) A rapid alkaline extraction method for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* 7: 1513-1524
- Blanchard, JL and Lynch, M (2000) Organellar genes – why do they end up in the nucleus? *Trends in Genetics* 16(7): 315-320
- Blum H, Beier H & Gross HJ (1987): Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8: 93-99
- de Boer, D and Weisbeek, P (1991): Chloroplast Protein topogenesis: Import, sorting and assembly. *Biochim Biophys Acta* 1071: 221-253
- Boudreau, E, Nickelsen, J, Lemaire, SD, Ossenbuhl, F, Rochaix, JD (2000) The Nac2 gene of *Chlamydomonas* encodes a chloroplast TPR-like protein involved in psbD mRNA stability. *EMBO J* 19(13):3366-3376
- Boudreau, E, Takahashi, Y, Lemieux, C, Turmel, M and Rochaix, JD (1997) The chloroplast ycf3 and ycf4 open reading frames of *Chlamydomonas reinhardtii* are required for the accumulation of the photosystem I complex. *EMBO J* 16: 6095-6104
- Bowyer, JR, Packer, JC, McCormack, BA, Whitelegge, JP, Robinson, C and Taylor, MA (1992) Carboxyl-terminal processing of the D1 protein and photoactivation of water-splitting in photosystem II. Partial purification and characterization of the processing enzyme from *Scenedesmus obliquus* and *Pisum sativum*. *J Biol Chem* 267(8):5424-5433
- Bradford, MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254
- Brent, R and Finley, RL, Jr (1997) Understanding gene and allele function with two hybrid methods. *Annu Rev Genet* 31: 663-704
- Bucher, P and Bairoch A (1994) A generalized profile syntax for biomolecular sequences motifs and its function in automatic sequence interpretation. In: ISMB-94; Proceedings 2nd International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology. Altman, R, Brutlag, D, Karp, P, Lathrop, R, Searls, D, Eds., pp53-61, AAAIPress, Menlo Park, (1994)
- Bullock, W, Fernandez, JM and Short, MJ (1987) XL1-Blue: High efficiency plasmid transforming recA *E. coli* strain with β -galactosidase selection. *Biotechniques* 5: 376-380.

- Burnap, RL and Sherman, LA (1991) Deletion mutagenesis in *Synechocystis* sp. PCC6803 indicates that the Mn-stabilizing protein of photosystem II is not essential for O₂ evolution. *Biochemistry* 30: 440-446
- Chaddock, AM, Mant, A, Karnauchoy, I, Brink, S, Herrmann, RG, Klosgen, RB and Robinson, C (1995) A new type of signal peptide: central role of a twin-arginine motif in transfer signals for the delta pH-dependent thylakoidal protein translocase. *EMBO J* 14(12): 2715-2722
- Choquet, Y and Vallon, O (2000) Synthesis, assembly and degradation of thylakoid membrane proteins. *Biochimie* 82(6-7):615-634
- Clark, SA and Theg, SM (1997) A folded protein can be transported across the chloroplast envelope and thylakoid membranes. *Mol Biol Cell* 8(5):923-934
- Cline, K, Andrews, J, Mersey, B, Newcomb, EH and Keegstra, K (1981) Separation and characterization of inner and outer envelope membranes of pea chloroplasts. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 78: 3595-3599
- Cline, K, Werner-Washburne, M, Lubben, TH and Keegstra, K (1984) Thermolysin is a suitable protease for probing the surface of intact pea chloroplasts. *Plant Physiol.* 75: 675-67
- Cline, K, Henry, R, Li, C and Yuan, J (1993) Multiple pathways for protein transport into or across the thylakoid membrane. *EMBO J* 12: 4105-4114
- Cohen, Y, Yalovsky, S and Nechushtai, R (1995): Integration and assembly of photosynthetic protein complexes in chloroplast thylakoid membranes. *Biochim Biophys Acta* 1241: 1-30
- Dalbey, RE and Robinson, C (1999) Protein translocation into and across the bacterial plasma membrane and the plant thylakoid membrane. *Trends Biochem Sci* 24: 17-22
- Danon, A and Mayfield, SP (1991) Light-regulated translational activators: identification of chloroplast gene specific mRNA binding proteins. *EMBO J* 10: 3993-4001
- Danon, A and Mayfield, SP (1994) Light-regulated translation of chloroplast messenger RNAs through redox potential. *Science* 266: 1717-1719
- Demmig-Adams, B and Adams III, WW (1996) The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends Plant Sci* 1(1): 21-26
- Deng, XW & Gruissem, W (1987): Control of plastid gene expression during development: the limited role of transcriptional regulation. *Cell* 49: 379-387
- Deng, XW, Tonkyn, JC, Peter, GF, Thornber, JP and Gruissem, W (1989) Post-transcriptional control of plastid mRNA accumulation during adaptation of chloroplasts to different light quality environments. *Plant Cell* 1: 645-654
- Dibrov, E, Fu, S and Lemire, BD (1998) The *Saccharomyces cerevisiae* TCM62 gene encodes a chaperone necessary for the assembly of the mitochondrial succinate dehydrogenase (complex II). *J Biol Chem* 273(48): 32042-32048
- Douce, R, Block, MA, Dorne, AJ and Joyard, J (1984): The plastid envelope membranes: Their structure, composition and role in chloroplast biogenesis. *Subcell Biochem* 10: 1-84
- Douglas, SE (1994): Chloroplast origins and evolution. In: Bryant DA (Ed) *The Molecular Biology of Cyanobacteria*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 91-118
- Douglas, SE (1998) Plastid evolution: origins, diversity, trends. *Curr Opin Genet Dev* 8(6):655-661
- Douglas, SE and Penny, SL (1999) The plastid genome of the cryptophyte alga, *Guillardia theta*: complete sequence and conserved synteny groups confirm its common ancestry with red algae. *J Mol Evol.* 48(2):236-44
- Driemel, C, (2000) Biochemische und genetische Analysen von Photosystem II-Mutanten bei *Arabidopsis thaliana*. Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, Diplomarbeit
- Economou A (1998) Bacterial preprotein translocase: Mechanism and conformational dynamics of a processive enzyme. *Mol Microbiol* 27: 511-518

- Edhofer, I, Mühlbauer, SK and Eichacker, LA (1998) Light regulates the rate of translation elongation of chloroplast reaction center protein D1. *Eur J Biochem* 257(1): 78-84
- Eichacker, LA, Helfrich, M, Rüdiger, W, and Müller, B (1996) Stabilization of chlorophyll a-binding apoproteins P700, CP47, CP43, D2, and D1 by chlorophyll a or Zn-pheophytin a. *J Biol Chem* 271(50):32174-32179
- Eichacker, LA, Paulsen, H and Rüdiger, W (1992) Synthesis of chlorophyll a regulates translation of chlorophyll a apoproteins P700, CP47, CP43 and D2 in barley etioplasts. *Eur J Biochem* 205: 17-24
- Eichacker, LA, Soll, J, Lauterbach, P, Rüdiger, W, Klein, RR and Mullet, JE (1990) In vitro synthesis of chlorophyll a in the dark triggers accumulation of chlorophyll a apoproteins in barley etioplasts. *J Biol Chem* 265: 13566-13571
- Eisenberg, D, Schwarz, E, Komaromy, M and Wall, R (1984) Analysis of membrane and surface protein sequences with the hydrophobic moment plot. *J.Mol.Biol.* 179, 125-142
- Erickson, JM and Rochaix, JD (1992): The molecular biology of photosystem II. In: Barber, J (Ed) *Topics in Photosynthesis, Vol. 11, The Photosystems: Structure, Function and Molecular Biology*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp. 101-177
- Ermakova-Gerdes, S and Vermaas W (1999) Inactivation of the open reading frame slr0399 in *Synechocystis sp.* PCC 6803 functionally complements mutations near the Q(A) niche of photosystem II. A possible role of Slr0399 as a chaperone for quinone binding. *J Biol Chem* 274(43):30540-30549
- Färber, A, Young, AJ, Ruban, AV, Horton, P and Jahns P (1997) Dynamics of xanthophyll-cycle activity in the photosynthetic membranes of higher plants. *Plant Physiol* 115:1609-1618
- Faloona, F and Mullis, KB (1987): *Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase chain reaction*. *Methods Enzym Mol* 155: 335-350
- Felder, S (1999) Genetische und molekularbiologische Analyse der RNA-Prozessierung des psbB-Operons von *Arabidopsis thaliana*, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, Dissertation
- Feldmann, KA (1991): T-DNA insertion mutagenesis in *Arabidopsis*: mutational spectrum. *Plant J* 1: 71-82
- Feldmann, KA (1992): T-DNA insertion mutagenesis in *Arabidopsis*: seed infection / transformation. In: Koncz C, Chua N-H and Schell J (Eds) *Methods in Arabidopsis Research*. World Scientific, Singapore, pp. 274-289
- Fisk, DG, Walker, MB and Barkan, A (1999) Molecular cloning of the maize gene *crp1* reveals similarity between regulators of mitochondrial and chloroplast gene expression. *EMBO J* 18(9):2621-2630
- Fromont-Racine, M, Rain, JC and Legrain, P (1997) Toward a functional analysis of the yeast genome through exhaustive two-hybrid screens. *Nature genetics* Vol. 16: 277-282
- Fujiki, Y, Hubbard, AL, Fowler, S and Lazarow, PB (1982) Isolation of intracellular membranes by means of sodium carbonate treatment: application to endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 93(1):97-102
- Gatenby, AA and Ellis, RJ (1990) Chaperone function: The assembly of ribulose biphosphate carboxylase-oxygenase. *Annu Rev Cell Biol* 6: 125-149
- Gau, AE, Thole, HH, Sokolenko, A, Altschmied, L, Hermann, RG and Pistorius, EK (1998) PsbY, a novel manganese-binding, low-molecular-mass protein associated with photosystem II. *Mol Gen Genet* 260(1):56-68
- Gavel, Y and von Heijne, G (1990) A conserved cleavage-site motif in chloroplast transit peptides. *FEBS Lett* 261(2): 455-458
- Genty, B, Harbinson, J, Briantis, JM and Baker, NR (1989) The relationship between nonphotochemical quenching of chlorophyll fluorescence and the rate of photosystem II chemistry in leaves. *Photosynth Res* 25: 249-257
- Ghanotakis, F and Yocum, CF (1990) Photosystem II and the oxygen-evolving complex. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 41: 255-276

- Glerum, DM, Koerner, TJ and Tzagoloff, A (1995) Cloning and characterization of COX14, whose product is required for assembly of yeast cytochrome oxidase. *J Biol Chem* 270: 15585-15590
- Glerum, DM, Muroff, I, Jin, C and Tzagoloff, A (1997) COX15 codes for a mitochondrial protein essential for the assembly of yeast cytochrome oxidase. *J Biol Chem* 272: 19088-19094
- Goldschmidt-Clermont, M (1998) Coordination of nuclear and chloroplast gene expression in plant cells. *Int Rev Cytol* 177: 115-180
- Goodman HM, Eckers JR and Dean C (1995): The genome of *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 10831-10835.
- Gottesman, S, Wickner, S and Maurizi, MR (1997) Protein quality control: Triage by chaperones and proteases. *Genes Dev* 11: 815-823
- Gray, MW (1999) Evolution of organellar genomes. *Curr Opin Genet Dev* 9(6):678-687
- Griffiths, WT (1975) Some Observations on Chlorophyll(ide) Synthesis by Isolated Etioplasts. *Biochem J* 146: 17-24
- Grover, M, Gaur, T, Kochhar, A, Maheshwari, SC and Tyagi, AK (1999) Nucleotide sequence of psbQ gene for 16-kDa protein of oxygen-evolving complex from *Arabidopsis thaliana* and regulation of its expression. *DNA Res* 6(3):173-177
- Gruissem, W (1989): Chloroplast gene expression: how plants turn their plastids on. *Cell* 56: 161-170
- Gruissem, W and Tonkyn, JC (1993) Control mechanisms of plastid gene expression. *Crit Rev Plant Sci* 12: 19-55
- Guenther, JE and Melis, A (1990) The physiological significance of photosystem II heterogeneity in chloroplasts. *Photosynth Res.* 23: 105-109
- Hager, D.A. and Burgess, R.R. (1980) Elution of proteins from sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels, removal of sodium dodecyl sulfate and renaturation of enzymatic activity: results with sigma subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase, wheat germ DNA topoisomerase and other enzymes. *Anal. Biochem.* 109: 1676-1680.
- Hajdukiewicz, PTJ, Allison, LA and Maliga, P (1997) The two RNA polymerases encoded by the nuclear and the plastid compartments transcribe distinct groups of genes in tobacco plastids. *EMBO J* 16(13): 4041-4048
- Hallick, RB, Hong, L, Drager, RG, Favreau, MR, Monfort, A, Orsat, B, Spielmann, A and Stutz, E (1993) Complete sequence of *Euglena gracilis* chloroplast DNA. *Nucleic Acids Res.* 21, 3537-3544
- Halliwell, B (1981) Chloroplast metabolism: the structure and function of chloroplasts in green leaf cells. B. Halliwell, Oxford: Clarendon Pr.
- Han, KC, Shen, JR, Ikeuchi, M and Inoue, Y (1994) Chemical crosslinking studies of extrinsic proteins in cyanobacterial photosystem II. *FEBS Lett.* 355(2):121-124
- Hanahan, D, Jessee, J and Bloom, FR (1991) Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Meth. Enzymol.* 204: 63-113.
- Hankamer, B, Barber, J and Boekema, EJ (1997a) Structure and membrane organization of photosystem II in green plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48: 641-671
- Hankamer, B, Nield, J, Zheleva, D, Boekema, E, Jansson, S and Barber, J (1997b) Isolation and biochemical characterisation of monomeric and dimeric photosystem II complexes from spinach and their relevance to the organisation of photosystem II in vivo. *Eur J Biochem* 243(1-2):422-429
- Harper, JW, Adami, GR, Wei, N, Keyomarsi, K and Elledge, SJ (1993) The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 75: 805-816.
- Hartl, DL and Ochman, H (1996) Inverse polymerase chain reaction. *Methods Mol Biol* 58:293-301

- Hartl, FU (1996) Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 381: 571-580
- Hashimoto, A, Yamamoto, Y and Theg, SM (1996) Unassembled subunits of the photosynthetic oxygen-evolving complex present in the thylakoid lumen are long-lived and assembly-competent. *FEBS Lett* 391: 29-34
- Haward, SR, Napier, JA AND Gray, C (1997) Chloroplast SecA functions as a membrane-associated component of the Sec-like protein translocase of pea chloroplasts. *Eur J Biochem* 248: 724-730
- Hayes, R, Kudla, J, Schuster, G, Gabay, L, Maliga, P and Gruissem, W (1996) Chloroplast mRNA 3'-end processing by a high molecular weight protein complex is regulated by nuclear encoded RNA binding proteins. *EMBO J* 15: 1132-1141
- von Heijne G, Steppuhn J & Herrmann RG (1989): Domain structure of mitochondrial and chloroplast targeting peptides. *Eur J Biochem* 180: 535-545.
- Heins, L, Collinson, I and Soll, J (1998) The protein translocation apparatus of chloroplast envelopes. *Trends Plant Sci* 3(2): 56-61
- Helmchen, TA, Bhattacharya, D and Melkonian, M (1995): Analyses of ribosomal RNA sequences from Glaucocystophyte cyanelles provide new insights into the evolutionary relationships of plastids. *J Mol Evol* 41: 203-210
- Henry, R, Carrigan, M, McCaffrey, M, Ma, X and Cline, K (1997) Targeting determinants and proposed evolutionary basis for the Sec and the Delta pH protein transport systems in chloroplast Thylakoid membranes. *J Cell Biol* 136(4): 823-832
- Herrin, DL, Battey, JF, Greer, K and Schmidt, GW (1992) Regulation of chlorophyll apoprotein expression and accumulation. Requirements for carotenoids and chlorophyll. *J Biol Chem* 267 (12): 8260-8269
- Hermanson, GT (1996) Bioconjugate techniques. Academic Press, San Diego, Kalifornien
- Hofmann, K, Bucher, P, Falquet, L and Bairoch, A (1999) The PROSITE database, its status in 1999. *Nucleic Acids Res.* 27:215-219
- Holmes, DS and Quigley, M (1981) A rapid boiling method for the separation of bacterial plasmids. *Anal Biochem* 114: 193-197
- Hynds, PJ, Plücker, H, Westhoff, P and Robinson, C (2000) Different lumen-targeting pathways for nuclear-encoded versus cyanobacterial/plastid-encoded HCF136 proteins. *FEBS Lett.* 467: 97-100
- Hynds, PJ, Robinson, D and Robinson, C (1998) The sec-independent twin-arginine translocation system can transport both tightly folded and malformed proteins across the thylakoid membrane. *J Biol Chem* 273(52): 34868-34874
- Igloi GL and Kössel, H (1992) The transcriptional apparatus of chloroplasts. *Crit Rev Plant Sci* 10: 525-558
- Ikeuchi M, Eggers, B, Shen, G, Webber, A, Yu, J, Hirano, A, Inoue, Y and Vermaas, W (1991) Cloning of the psbK gene from *Synechocystis* sp. PCC 6803 and characterization of photosystem II in mutants lacking PSII-K. *J Biol Chem* 266: 11111-11115
- Ikeuchi, M, Koike, H and Inoue, Y (1989) N-terminal sequencing of low-molecular-mass components in cyanobacterial photosystem II core complex. Two components correspond to unidentified open reading frames of plant chloroplast DNA. *FEBS Lett* 253(1-2):178-182
- Ikeuchi, M, Shukla, VK, Pakrasi, HB and Inoue, Y (1995) Directed inactivation of the psbI gene does not affect Photosystem II in the cyanobacterium *Synechocystis* sp PCC 6803. *Mol.Gen.Genet.* 249: 622-628
- Irrgang, KD, Shi, LX, Funk, C and Schroder, WP (1995) A nuclear-encoded subunit of the photosystem II reaction center. *J Biol Chem* 270(29): 17588-17593
- Isono, K, Shimizu, M, Yoshimoto, K, Niwa, Y, Satoh, K, Yokota, A and Kobayashi, H (1997) Leaf-specifically expressed genes for polypeptides destined for chloroplasts with domains of σ^{70} factors of bacterial RNA polymerases in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Nat Acad Sci USA* 94: 14948-14953

- Jagendorf AT & Michaels A (1990) Rough thylakoids: translation on photosynthetic membranes. *Plant Science* 71:137-145
- James, P, Halladay, J and Craig, EA (1996) Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* 144: 1425-1436.
- Jensen, KH, Herrin, DL, Plumley, FG and Schmidt, GW (1986) Biogenesis of photosystem II complexes: transcriptional, translational, and posttranslational regulation. *J Cell Biol* 103: 1315-1325
- Joshi, CP (1987) An inspection of the domain between putative TATA-box and translation start site in 79 plant genes. *Nucl.Acids Res.* 15, 6643-6653.
- Kaneko, T, Sato, S, Kotani, H, Tanaka, A, Asamizu, E, Nakamura, Y, Miyajima, N, Hirosawa, M, Sugiura, M, Sasamoto, S, Kimura, T, Hosouchi, T, Matsuno, A, Muraki, A, Nakazaki, N, Naruo, K, Okumura, S, Shimpo, S, Takeuchi, C, Wada, T, Watanabe, A, Yamada, M, Yasuda, M and Tabata, S (1996) Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *DNA Research* 3, 109-136
- Kapazoglou, A, Sagliocco, F and Dure L 3rd (1995) PSII-T, a new nuclear encoded luminal protein from photosystem II. Targeting and processing in isolated chloroplasts. *J Biol Chem* 270(20):12197-12202
- Karnauchov, I, Herrmann, RG, and Klösgen, RB (1997) Transmembrane topology of the Rieske Fe/S protein of the cytochrome b6/f complex from spinach chloroplasts. *FEBS Lett.* 408: 206-210
- Keegstra, K and Cline, K (1999) Protein import and routing system of chloroplasts. *Plant Cell* 11: 557-570
- Keegstra, K, Olsen, LJ and Theg, SM (1989): Chloroplastic precursors and their transport across the envelope membranes. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 40: 471-501
- Kettunen, R, Tyystjarvi, E, Aro, EM (1996) Degradation pattern of photosystem II reaction center protein D1 in intact leaves. The major photoinhibition-induced cleavage site in D1 polypeptide is located amino terminally of the DE loop. *Plant Physiol* 111(4):1183-1190
- Kettunen, R, Pursiheimo, S, Rintamaki, E, Van Wijk, KJ and Aro, EM (1997) Transcriptional and translational adjustments of psbA gene expression in mature chloroplasts during photoinhibition and subsequent repair of photosystem II. *Eur J Biochem* 247(1):441-448
- Kim, J, Klein, PG and Mullet, JE (1991) Ribosomes pause at specific sites during synthesis of membrane-bound chloroplast reaction center protein D1. *J Biol Chem* 266(23): 14931-14938
- Kim, J, Eichacker, LA, Rudiger, W and Mullet JE (1994a) Chlorophyll regulates accumulation of the plastid-encoded chlorophyll proteins P700 and D1 by increasing apoprotein stability. *Plant Physiol* 104(3):907-916
- Kim, J, Klein, PG and Mullet, JE (1994b) Synthesis and turnover of photosystem II reaction center protein D1. Ribosome pausing increases during chloroplast development. *J.Biol.Chem.* 269: 17918-17923
- Kim, J, Klein, PG and Mullet, JE (1994c) Vir-115 gene product is required to stabilize D1 translation intermediates in chloroplasts. *Plant Mol Biol* 25(3):459-467
- Kim, J and Mayfield SP (1997) Protein disulfide isomerase as a regulator of chloroplast translational activation. *Science* 278: 1954-1957
- Klopstech, K (1997) Light regulation of photosynthetic genes. *Physiol Plant* 100: 739-747
- Kochhar, A, Khurana, JP and Tyagi, AK (1996) Nucleotide sequence of the psbP gene encoding precursor of 23-kDa polypeptide of oxygen-evolving complex in *Arabidopsis thaliana* and its expression in the wild-type and a constitutively photomorphogenic mutant. *DNA Res* 3(5):277-285
- Koivuniemi, A, Aro, EM and Andersson, B (1995) Degradation of the D1- and D2-proteins of photosystem II in higher plants is regulated by reversible phosphorylation. *Biochemistry* 34(49):16022-16029
- Koncz, C, Martini, N, Szabados, L, Hroudá, M, Bachmair, A and Schell, J (1994) Specialized vectors for gene tagging and expression studies. In Gelvin, SB and Schilperoort, RA (eds), *Plant Molecular Biology Manual*. Vol B2. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 1-22.

- van Kooten, O and Snel, JFH (1990) The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. *Photosynth. Res.* 25: 147-150
- Kowallik, KV (1993): Origin and evolution of plastids from chlorophyll a + c-containing algae: Suggested ancestral relationships to red and green algal plastids. In: Lewin RA (ed) *Origins of Plastids: Symbiogenesis, Prochlorophytes and the Origins of the Chloroplasts*. Chapman and Hall, New York, pp 223-263
- Kowallik, KV, Stöbe, B, Schaffran, I, Kroth-Pancic, P and Freier, U (1995) The chloroplast genome of a chlorophyll a+c-containing alga, *Odontella sinensis*. *Plant Mol Biol Rep* 13, 336-342
- Krause, GH and Weis, E (1991) Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The basics. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 42, 313-349
- Kubicki, A, Steinmuller, K, and Westhoff, P (1994) Differential transcription of plastome-encoded genes in the mesophyll and bundle-sheath chloroplasts of the monocotyledonous NADP-malic enzyme-type C4 plants maize and Sorghum. *Plant Mol Biol* 25(4):669-79
- Kudla, J, Hayes, R and Gruissem, W (1996) Polyadenylation accelerates degradation of chloroplast mRNA. *EMBO J* 15: 7137-7146
- Kuffner, R, Rohr, A, Schmiede, A, Krull, C and Schulte, U (1998) Involvement of two novel chaperones in the assembly of mitochondrial NADPH:Ubiquinone oxidoreductase (complex I). *J Mol Biol* 283(2): 409-417
- Künstner, P, Guardiola, A, Takahashi, Y and Rochaix, JD (1995) A mutant strain of *Chlamydomonas reinhardtii* lacking the chloroplast photosystem II psbI gene grows photoautotrophically. *J Biol Chem* 270: 9651-9654
- Laemmli, UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
- Lecrenier, N, Foury, F and Goffou, A (1998) Two-hybrid systematic screening of the yeast proteome. *BioEssays* 20: 1-6
- Lee, AI and Thornber, JP (1995) Analysis of the pigment stoichiometry of pigment-protein complexes from barley (*Hordeum vulgare*): The xanthophyll cycle intermediates occur mainly in the light-harvesting complexes of photosystem I and photosystem II. *Plant Physiol* 107: 565-574
- Lerbs-Mache, S (1993) The 110 kDa polypeptide of spinach plastid DNA-dependent RNA polymerase: Single-subunit enzyme or catalytic core of multimeric enzyme complexes? *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 5509-5513
- Levy, H, Kindle, KL and Stern, DB (1997) A nuclear mutation that affects the 3' processing of several mRNAs in *Chlamydomonas* chloroplasts. *Plant Cell* 9: 825-836
- Li, XP, Bjorkman, O, Shih, C, Grossman, AR, Rosenquist, M, Jansson, Sa and Niyogi, KK (2000) A pigment-binding protein essential for regulation of photosynthetic light harvesting. *Nature* 403(6768):391-5
- Lichtenthaler, HK and Miehe (1997) Fluorescence imaging as a diagnostic tool for plant stress. *Trends Plant Sci* 2(8): 316-320
- Lind, LK, Shukla, VK, Nyhus, KJ and Pakrasi, HB (1993) Genetic and immunological analyses of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 show that the protein encoded by the psbJ gene regulates the number of photosystem II centers in thylakoid membranes. *J Biol Chem* 268(3): 1575-1579
- Lindahl, M, Spetea, C, Hundal, T, Oppenheim, AB, Adam, Z and Andersson, B (2000) The thylakoid FtsH protease plays a role in the light-induced turnover of the photosystem II D1 protein. *Plant Cell* 12(3):419-431
- Lindahl, M, Tabak, S, Cseke, L, Pichersky, E, Andersson, B and Adam, Z (1996) Identification, characterization, and molecular cloning of a homologue of the bacterial FtsH protease in chloroplasts of higher plants. *J Biol Chem* 271: 29329-29334

- Liu, XL and DeMoss, JA (1997) Characterization of NarJ, a system-specific chaperone required for nitrate reductase biogenesis in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 272: 24266-24271
- Ljungberg U, Jansson C, Andersson B and Åkerlund HE (1983) Reconstitution of oxygen evolution in high salt washed photosystem II particles. *Biochem Biophys Res Commun* 113(3):738-744
- Lutcke, HA, Chow, FS, Mickel, KFS, Moss, KA, Kern, HF and Scheele, GA (1987) Selection of AUG initiation codon differs in plants and animals. *EMBO J* 6, 43-48.
- Maier, UG, Douglas, SE and Cavalier-Smith, T (2000) The nucleomorph genomes of cryptophytes and chlorarachniophytes. *Protist* 151(2):103-9
- Mackay, SP and O'Malley, PJ (1993) Molecular modelling of the interaction between DCMU and Q_B-binding site of photosystem II. *Z Naturforsch* 48(3-4): 291-298
- Marshall, JS, DeRocher, AE, Keegstra, K and Vierling, E (1990) Identification of heat shock protein hsp70 homologues in chloroplasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 374-378
- Martin, W and Herrmann, RG (1998) Gene transfer from organelles to the nucleus: How much, what happens, and why? *Plant Physiol* 118: 9-17
- Martin, W, Somerville, CC and Loiseaux-de Goer, S (1992) Molecular phylogenies of plastid origins and algal evolution. *J Mol Evol* 35: 385-404
- Martin, W, Stoebe, B, Goremykin, V, Hansmann, S, Hasegawa, M and Kowallik, K (1998): Gene transfer to the nucleus and the evolution of chloroplasts. *Nature* 393: 162-165
- Mattoo, AK and Edelman, M (1987) Intramembrane translocation and posttranslational palmitoylation of the chloroplast 32-kDa herbicide-binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 84(6):1497-1501
- Mayes, SR, Dubbs, JM, Vass, I, Hideg, Nagy, L and Barber, J (1993) Further characterization of the psbH locus of *Synechocystis* sp. PCC 6803: Inactivation of psbH impairs Q_A to Q_B electron transport in Photosystem II. *Biochemistry* 32: 1454-1465
- Mayfield, SP, Bennoun, P and Rochaix, JD (1987) Expression of the nuclear encoded OEE1 protein is required for oxygen evolution and stability of photosystem II particles in *Chlamydomonas reinhardtii*. *EMBO J* 6: 313-318
- Mayfield, SP, Yohn, CB, Cohen, A and Danon, A (1995) Regulation of chloroplast gene expression. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 46: 147-166
- McNamara, VP, Sutterwala, FS, Pakrasi, HB and Whitmarsh, J (1997) Structural model of cytochrome b559 in photosystem II based on a mutant with genetically fused subunits. *PNAS* 94: 14173-14178
- Meierhoff K & Westhoff P (1993): Differential biogenesis of photosystem II in mesophyll and bundle-sheath cells of monocotyledonous NADP-malic enzyme-type C4 plants: The non-stoichiometric abundance of the subunits of photosystem II in the bundle-sheath chloroplasts and the translational activity of the plastome-encoded genes. *Planta* 191: 23-33
- Melis, A (1991) Dynamics of photosynthetic membrane composition and function. *Biochim Biophys Acta Bio-Energetics* 1058, 87-106
- Mereschkowsky C (1905): Über die Natur und den Ursprung der Chromatophoren im Pflanzenreiche. *Biol Centr* 25: 593-604 und 689-691
- Meurer, J (1996c): Spektroskopische, genetische und molekulare Analysen nukleärer Photosynthesemutanten von *Arabidopsis thaliana*. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Dissertation
- Meurer J, Berger A and Westhoff P (1996a): A nuclear mutant of *Arabidopsis* with impaired stability on distinct transcripts of the plastid psbB, psbD/C, ndhH, and ndhC operons. *Plant Cell* 8: 1193-1207.
- Meurer, J, Meierhoff, K and Westhoff, P (1996b) Isolation of high chlorophyll fluorescence mutants of *Arabidopsis thaliana* and their characterization by spectroscopy, immunoblotting and Northern hybridisation. *Planta* 198: 385-396

- Meurer, J, Plücken, H, Kowallik, KV and Westhoff, P (1998) A nuclear-encoded protein of prokaryotic origin is essential for the stability of photosystem II in *Arabidopsis thaliana*. EMBO J. 17: 5286-5297
- Miles, D (1982) The use of mutations to probe photosynthesis in higher plants. In : Edelman M, Hallick R and Chua NH (Eds) Methods in Chloroplast Molecular Biology. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, pp. 75-107
- Miles, D (1994): The use of high chlorophyll fluorescence photosynthetic mutants in the analysis of chloroplast thylakoid membrane assembly and function. Maydica 39: 35-45
- Monod, C, Goldschmidt-Clermont, M and Rochaix, JD (1992) Accumulation of chloroplast psbB RNA requires a nuclear factor in *Chlamydomonas reinhardtii*. Mol Gen Genet 231: 449-459
- Monod, C, Takahashi, Y, Goldschmidt-Clermont, M and Rochaix, JD (1994) The chloroplast ycf8 open reading frame encodes a photosystem II polypeptide which maintains photosynthetic activity under adverse growth conditions. EMBO J 13: 2747-2754
- Moreira, D, Le Guyader, H, and Phillippe, H (2000) The origin of red algae and the evolution of chloroplasts. Nature 405(6782):69-72
- Mori, H and Cline, K (1998) A signal peptide that directs non-Sec transport in bacteria also directs efficient and exclusive transport on the thylakoid Delta pH pathway. J Biol Chem 273(19): 11405-11408
- Müller, B (2000) Biogenese des Photosyntheseapparates der Gerste: Regulation der Assemblierung des Photosystem I und II. Ludwig-Maximilians-Universität München, Dissertation
- Müller, B and Eichacker, LA (1999) Assembly of the D1 Precursor in Monomeric Photosystem II Reaction Center Precomplexes Precedes Chlorophyll a-Triggered Accumulation of Reaction Center II in Barley Etioplasts. Plant Cell 11(12):2365-2378
- Mullet, JE (1988): Chloroplast development and gene expression. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 39: 475-502
- Mullet, JE, Klein, PG and Klein, RR (1989) Chlorophyll regulates accumulation of the plastid-encoded chlorophyll apoproteins CP43 and D1 by increasing apoprotein stability. Proc Natl Acad Sci 87(11):4038-4042
- Murashige, T and Skoog, F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-497
- Nanba, O and Satoh, K (1987) Isolation of a photosystem II reaction center consisting of D1 and D2 polypeptides and cytochrome b₅₅₉. Proc Natl Acad Sci USA 84: 109-112
- Nickelsen, J, van Dillewijn, J, Rahire, M and Rochaix, JD (1994) Determinants for stability of the chloroplast psbD RNA are located within its short leader region in *Chlamydomonas reinhardtii*. EMBO J 13: 3182-3191
- Nield, J, Kruse, O, Ruprecht, J, da Fonseca, P, Büchel, C and Barber, J (2000) Three-dimensional structure of *Chlamydomonas reinhardtii* and *Synechococcus elongatus* photosystem II complexes allows for comparison of their oxygen-evolving complex organization. J Biol Chem 275(36):27940-6
- Nilsson, R, Brunner, J, Hoffman, NE and van Wijk KJ (1999) Interactions of ribosome nascent chain complexes of the chloroplast-encoded D1 thylakoid membrane protein with cpSRP54. EMBO J 18(3):733-42
- Nugent, JH (1996) Oxygenic photosynthesis. Electron transfer in photosystem I and photosystem II. Eur J Biochem 237(3):519-531
- Oelmüller, R, Herrmann, RG and Pakrasi, HB (1996) Molecular studies of CtpA, the carboxyl-terminal processing protease for the D1 protein of the photosystem II reaction center in higher plants. J Biol Chem 271(36):21848-52
- Oliver, JL, Marin, A and Martinez-Zapater, JM (1989) Chloroplast genes transferred to the nuclear plant genome have adjusted to nuclear base composition and codon usage. Nucleic Acids Res 18(1): 65-73

- Ono, TA and Inoue, Y (1983) Mn-preserving extraction of 33-, 24- and 16 kD proteins from O₂-evolving PS II particles by divalent salt washing. *FEBS Lett* 164(2): 255-259
- Oswald, A, Streubel, M, Ljungberg, U, Hermans, J, Eskins, K and Westhoff, P (1990) Differential biogenesis of photosystem II in mesophyll and bundle sheath cells of NADP malic enzyme-type C4 plants. A comparative protein and RNA analysis. *Eur J Biochem* 190: 185-194
- Pakrasi, HB (1995) Genetic analysis of the form and function of photosystem I and photosystem II. *Annu Rev Genet* 29: 755-776
- Pakrasi, HB, Diner, BA, Williams, JGK and Arntzen, CJ (1989a) Deletion mutagenesis of the cytochrome b₅₅₉ protein inactivates the reaction center of photosystem II. *Plant Cell* 1: 591-597
- Pakrasi, HB, Nyhus, KJ and Granok, H (1989b) Targeted deletion mutagenesis of the b subunit of cytochrome b₅₅₉ protein destabilizes the reaction center of photosystem II. *Z.Naturforsch.* 45c, 423-429
- Pakrasi, HB, De Ciechi, P and Whitmarsh, J (1991) Site directed mutagenesis of the heme axial ligands of cytochrome b₅₅₉ affects the stability of the photosystem II complex. *EMBO J.* 10, 1619-1627
- Pfannschmidt, T, Nilsson, A and Allen, JF (1999) Photosynthetic control of chloroplast gene expression. *Nature* 397: 625-628
- Plücken, H (1997): Molekularbiologische Untersuchungen an der Photosystem II-Mutante *hcf136* von *Arabidopsis thaliana*. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Diplomarbeit
- Porra, RJ and Meisch, HU (1984) The biosynthesis of chlorophyll. *Trends Biochem Sci* 99-104
- Qian, M, Al-Khaldi, SF, Putnam-Evans, C, Bricker, TM and Burnap, RL (1997) Photoassembly of the photosystem II (Mn)₄ cluster in site-directed mutants impaired in the binding of the manganese-stabilizing protein. *Biochemistry* 36(49):15244-15252
- Race, HL, Herrmann, RG and Martin, W (1999) Why have organelles retained genomes? *Trends in Genetics* 15(9): 364-370
- Reinbothe, S and Reinbothe, C (1996) The regulation of enzymes involved in chlorophyll biosynthesis. *Eur J Biochem* 237(2):323-343
- Reith, M and Munholland, J (1995) Complete nucleotide sequence of the *Porphyra purpurea* chloroplast genome. *Plant Mol Biol Rep* 13, 333-335
- Rhee, KH, Morris, EP, Zheleva, D, Hankamer, B, Kühlbrandt, W and Barber, J (1997) Two dimensional structure of plant photosystem II at 8-Å resolution. *Nature* 389, 522-526
- Rhee, KH, Morris, EP, Barber, J and Kühlbrandt W (1998) Three-dimensional structure of the plant photosystem II reaction centre at 8 Å resolution. *Nature* 396(6708):283-6
- Rintamaki, E, Kettunen, R and Aro, EM (1996) Differential D1 dephosphorylation in functional and photodamaged photosystem II centers. Dephosphorylation is a prerequisite for degradation of damaged D1. *J Biol Chem* 271(25):14870-14875
- Robinson, C, Hynds, PJ, Robinson, D and Mant, A (1998) Multiple pathways for the targeting of thylakoid proteins in chloroplasts. *Plant Mol Biol* 38: 209-221
- Robinson, C and Mant, A (1997) Targeting of proteins into and across the thylakoid membrane. *Trends Plant Sci* 2: 431-437
- Robinson, KA and Lopes, JM (2000) SURVEY AND SUMMARY: *Saccharomyces cerevisiae* basic helix-loop-helix proteins regulate diverse biological processes. *Nucleic Acids Res.* 28(7):1499-505
- Rochaix, JD (1992) Post-transcriptional steps in the expression of chloroplast genes. *Annu Rev Cell Biol* 8: 1-28
- Rochaix, JD (1995) *Chlamydomonas reinhardtii* as the photosynthetic yeast. *Annu Rev Genet* 29: 209-230

- Rosenberg, C, Christian, J, Bricker, TM and Putnam-Evans, C (1999) Site-directed mutagenesis of glutamate residues in the large extrinsic loop of the photosystem II protein CP43 affects oxygen-evolving activity and PS II assembly. *Biochemistry* 38(48):15994-6000
- Ruban, AV, Young, AJ, Pascal, AA and Horton P (1994) The effects of illumination on the xanthophyll composition of the photosystem II light harvesting complex of spinach thylakoid membranes. *Plant Physiol* 104: 227-234
- Rüdiger, W, Benz, J and Guthoff, C (1980) Detection and partial characterization of activity of chlorophyll synthetase in etioplast membranes. *Eur J Biochem* 109(1):193-200
- Ruf, S, Kossel, H and Bock, R (1997) Targeted inactivation of a tobacco intron-containing open reading frame reveals a novel chloroplast-encoded photosystem I-related gene. *J Cell Biol* 139(1): 95-102
- Saiki, RK, Gelfand, DH, Stoffel, S, Scharf, SJ, Higuchi, R, Horn, GT, Mullis, KB and Erlich, HA (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491
- Sambrook, J, Fritsch, EF and Maniatis, T (1989) *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor
- Schlicher, T and Soll, J (1997) Chloroplastic isoforms of DnaJ and GrpE in pea. *Plant Mol Biol* 33: 181-185
- Schöneberg, U, Vahrson, W, Priedemuth, P and Wittig, B (1994) *Analysis and interpretation of DNA and protein sequences using MacMolly Tetra*. 3. ed Karoi-Verl Bornemann Bielefeld
- Schreiber, U (1986) Detection of rapid induction kinetics with a new type of high-frequency modulated chlorophyll fluorometer. *Photosynth. Res.* 9: 261-272
- Schreiber, U, Schliwa, U and Bilger, W (1986) Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynth. Res.* 10: 51-62
- Schuster, G, Ohad, I, Martineau, B and Taylor, WC (1985) Differentiation and development of bundle sheath and mesophyll thylakoids in maize. Thylakoid polypeptide composition, phosphorylation, and organization of photosystem II. *J.Biol.Chem.* 260, 11866-11873
- Seidler A (1996) Intermolecular and intramolecular interactions of the 33-kDa protein in photosystem II. *Eur J Biochem* 242(3):485-90
- Shägger, H, Cramer, WA, and von Jagow G (1994) Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane complexes by two-dimensional native electrophoresis. *Anal Biochem* 217: 220-230
- Shestakov, SV, Anbudurai, PR, Stanbekova, GE, Gadzhiev, A, Lind, LK and Pakrasi, HB (1994) Molecular cloning and characterization of the *ctpA* gene encoding a carboxyl-terminal processing protease. Analysis of a spontaneous photosystem II-deficient mutant strain of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J Biol Chem* 269(30):19354-19359
- Sharma, J, Panico, M, Barber, J and Morris, HR (1997) Purification and determination of intact molecular mass by electrospray ionization mass spectrometry of the photosystem II reaction center subunits. *J Biol Chem* 272(52):33153-33157
- Shanklin, J, DeWitt, ND and Flanagan, JM (1995) The stroma of higher plant plastids contain ClpP and ClpC, functional homologs of *Escherichia coli* ClpP and ClpA: An archetypal two-component ATP-dependent protease. *Plant Cell* 7: 1713-1722
- Shi, LX, Lorkovic, ZJ, Oelmüller, R and Schroeder, WP (2000) The low molecular mass PsbW protein is involved in the stabilization of the dimeric Photosystem II complex in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 18:
- Shi, LX, Kim, SJ, Marchant, A, Robinson, C and Schroeder, WP (1999) Characterisation of the PsbX protein from Photosystem II and light regulation of its gene expression in higher plants. *Plant Mol Biol* 40(4): 737-744

- Simon, R (1984) High frequency mobilization of gram-negative bacterial replicons by the *in vitro* constructed Tn5-Mob transposon. *Mol. Gen. Genet.* 196: 413-420
- Simonen, M and Palva, I (1993) Protein secretion in *Bacillus* species. *Microbiol Rev* 57(1):109-137
- Simpson, DJ, Vallon, O and von Wettstein, D (1989) Freeze-fracture studies on barley plastid membranes. VIII. In *viridis-115*, a mutant completely lacking Photosystem II, oxygen evolution enhancer 1 (OEE1) and the α -subunit of cytochrome b_{559} accumulate in appressed thylakoids. *Biochim.Biophys.Acta* 975: 164-174
- Soitamo, AJ, Zhou, G, Clarke, AK, Oquist, G, Gustafsson, P and Aro, EM (1996) Over-production of the D1:2 protein makes *Synechococcus* cells more tolerant to photoinhibition of photosystem II. *Plant Mol Biol* 30(3):467-78
- Stanley, NR, Palmer, T and Berks, BC (2000) The twin arginine consensus motif of Tat signal peptides is involved in Sec-independent protein targeting in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 275(16): 11591-11596
- Stewart, DH and Brudvig, GW (1998) Cytochrome b_{559} of photosystem II. *Biochim Biophys Acta* 1367(1-3):63-87
- Stern, DB, Higgs, DC and Yang, J (1997) Transcription and translation in chloroplasts. *Trends Plant Sci* 2: 308-315
- Stirewaldt, VL, Michalowski, CB, Löffelhardt, W, Bohnert, HJ and Bryant, DA (1995) Nucleotide Sequence of the Cyanelle Genome from *Cyanophora paradoxa*. *Plant Mol Biol Rep* 13(4) 327-332
- Strizhov, N, Keller, M, Mathur, J, Koncz-Kálmán, Z, Bosch, D, Prudovsky, E, Schell, J, Sneh, B, Koncz, C and Zilberstein, A (1996) A synthetic *cryIC* gene, encoding a *Bacillus thuringiensis* d-endotoxin, confers Spodoptera resistance in alfalfa and tobacco. *Proc. Natl Acad Sci. USA* 93: 15012-15017
- Sugita, M and Sugiura, M (1996) Regulation of gene expression in chloroplasts of higher plants. *Plant Mol Biol* 32: 315-326
- Sugiura, M. (1992) The chloroplast genome. *Plant Mol.Biol.* 19, 149-168
- Summer, EJ, Schmid, VHR, Bruns, BU and Schmidt, GW (1997) Requirement for the H phosphoprotein in photosystem II of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* 113: 1359-1368
- Sutton, A, Sieburth, LE and Bennett, J (1987) Light-dependent accumulation and localization of photosystem II proteins in maize. *Eur J Biochem* 164, 571-578
- Suzuki, CK, Rep, M, van Dijl, JM, Suda, K, Grivell, LA and Schatz, G (1997) ATP-dependent proteases that also chaperone protein biogenesis. *Trends Biochem Sci* 22: 118-123
- Tae, GS and Cramer, WA (1992) Truncation of the COOH-terminal domain of the *psbE* gene product in *Synechocystis* sp. PCC 6803: requirements for photosystem II assembly and function. *Biochemistry* 31(16):4066-4074
- Takahashi, Y, Matsumoto, H, Goldschmidt-Clermont, M and Rochaix, JD (1994) Directed disruption of the *Chlamydomonas* chloroplast *psbK* gene destabilizes the photosystem II reaction center complex. *Plant Mol Biol* 24: 779-788
- Taylor, WC (1989): Regulatory interactions between nuclear and plastid genomes. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 40: 211-233
- Thiel, T (1994): Genetic Analysis of Cyanobacteria. In: Bryant DA (Ed) *The Molecular Biology of Cyanobacteria*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 581-611
- Thompson, JD, Higgins, DG and Gobson, TJ (1994) CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673-4680
- Tomo, T, Enami, I and Satoh, K (1993) Orientation and nearest neighbor analysis of *psbI* gene product in the photosystem II reaction center complex using bifunctional cross-linkers. *FEBS Lett* 323(1-2): 15-18

- Towbin, H, Staehelin, T and Gordon, J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 76: 4350-4554
- Trissl, HWA and Wilhelm, C (1993) Why do thylakoid membranes from higher plants form grana stacks? *Trends Biochem Sci* 18(11):415-419
- Tsiotis G, Psylinakis M, Woplensinger B, Lustig A, Engel A, Ghanotakis D (1999) Investigation of the structure of spinach photosystem II reaction center complex. *Eur J Biochem* 259(1-2): 320-324
- Tzagoloff, A, Yue, J, Jang, J and Paul, MF (1994) A new member of a family of ATPases is essential for assembly of mitochondrial respiratory and ATP synthase complexes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Biol.Chem.* 269, 26144-26151
- Uetz, P and Hughes, RE (2000) Systematic and large-scale two-hybrid screens. *Curr Opin Microbiol* 3(3):303-8
- Valvekens, D, van Montagu, M and van Lijsebettens, M (1988) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* root explants by using kanamycin selection. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 5536-5540
- Vavilin, DV, Tyystjarvi, E and Aro, EM (1998) Model for the fluorescence induction curve of photoinhibited thylakoids. *Biophys J* 75(1):503-12
- Vermaas, W (1993) Molecular-biological approaches to analyze photosystem II structure and function. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 44, 457-481
- Vaistij, FE, Goldschmidt-Clermont, M, Wostrickoff, K and Rochaix, JD (2000) Stability determinants in the chloroplast psbB/T/H mRNAs of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J* 21(5): 469-482
- Viitanen, PV, Schmidt, M, Buchner, J, Suzuki, T, Vierling, E, Dickson, R, Lorimer, GH, Gatenby, A and Soll, J (1995) Functional characterization of the higher plant chloroplast chaperonins. *J Biol Chem* 270: 18158-18164
- de Vitry, C, Olive, J, Drapier, D, Recouvreur, M and Wollman, FA (1989) Posttranslational events leading to the assembly of photosystem II protein complex: A study using photosynthesis mutants from *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Cell Biol* 109: 991-1006
- Voelker, R and Barkan, A (1995): Two nuclear mutations disrupt distinct pathways for targeting proteins to the chloroplast thylakoid. *EMBO J* 14: 3905-3914
- Wakasugi, T, Nagai, T, Kapoor, M, Sugita, M, Ito, M, Ito, S, Tsudzuki, J, Nakashima, K, Tsudzuki, T, Suzuki, Y, Hamada, A, Ohta, T, Inamura, A, Yoshinaga, K and Sugiura, M (1997) Complete nucleotide sequence of the chloroplast genome from the green alga *Chlorella vulgaris*: The existence of genes possibly involved in chloroplast division. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 5967-5972
- Walker, MB, Roy, LM, Coleman, E, Voelker, R and Barkan, A (1999) The maize *tha4* gene functions in sec-independent protein transport in chloroplasts and is related to *hcf106*, *tatA*, and *tatB*. *J Cell Biol* 147(2):267-276
- Wastl, J, Duin, EC, Iuzzolino, L, Dorner, W, Link, T, Hoffmann, S, Sticht, H, Dau, H, Lingelbach, K, Maier, UG (2000) Eukaryotically Encoded and Chloroplast-located Rubredoxin Is Associated with Photosystem II. *J Biol Chem* 275(39):30058-30063
- Webb, R (1994): The Cyanobacterial Heat-Shock Response and the Molecular Chaperones. In: Bryant DA (Ed) *The Molecular Biology of Cyanobacteria*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 751-767
- Wellburn, AR and Hampp, R (1977) Changes in plastid and mitochondrial envelopes during greening. *Biochem Soc Trans* 5(1):91-94
- Westhoff, P and Herrmann, RG (1988) Complex RNA maturation in chloroplasts. The *psbB* operon from spinach. *Eur J Biochem* 171: 551-564
- Westhoff, P, Offermann-Steinhard, K, Höfer, M, Eskins, K, Oswald, A and Streubel, M (1991) Differential accumulation of plastid transcripts encoding photosystem II components in the mesophyll and bundle-sheath cells of monocotyledonous NADP-malic enzyme-type C4 plants. *Planta* 184. 377-388

- Westhoff, P, Schrubar, H, Oswald, A, Streubel, M and Offermann, K (1990) Biogenesis of photosystem II in C3 and C4 plants - a model system to study developmentally regulated and cell-specific expression of plastid genes. In Baltscheffsky, M. (ed.), Current Research in Photosynthesis, Vol. III. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 483-490
- Wickner, W, Driessen, AJM and Hartl, FU (1991) The enzymology of protein translocation across the *Escherichia coli* plasma membrane. *Annu Rev Biochem* 60: 101-124
- van Wijk, KJ, Andersson, B, and Aro, EM, (1996) Kinetic resolution of the incorporation of the D1 protein into photosystem II and localization of assembly intermediates in thylakoid membranes of spinach chloroplasts. *J Biol Chem* 271: 9627-9636
- van Wijk, KJ, Bingsmark, S, Aro, EM and Andersson, B (1995) In vitro synthesis and assembly of photosystem II core proteins. The D1 protein can be incorporated into photosystem II in isolated chloroplasts and thylakoids. *J Biol Chem* 270(43): 25685-25695
- van Wijk, KJ, Roobol-Boza, M, Kettunen, R, Andersson, B and Aro, EM (1997) Synthesis and assembly of the D1 protein into photosystem II: processing of the C-terminus and identification of the initial assembly partners and complexes during photosystem II repair. *Biochemistry* 36(20):6178-6186
- Wollenberger, L, Stefansson, H, Yu, SG and Albertson, P (1994) Isolation and characterization of vesicles originating from the chloroplast grana margins. *Biochim Biophys Acta* 1184: 93-102
- Wollman, FA, Limor, M and Nechushtai, R (1999) The biogenesis and assembly of photosynthetic proteins in thylakoid membranes. *Biochim Biophys Acta* 1411: 21-85
- Wolk, CP, Ernst, A and Elhai, J (1997) Heterocyst metabolism and development. In Bryant, DA (ed.), *The Molecular Biology of Cyanobacteria*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 769-823
- Woo, KC, Anderson, JM, Boardman, NK, Downton, WJS, Osmond, CB and Thorne, SW (1970) Deficient photosystem II in agranal bundle sheath chloroplasts of C4 plants. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 67, 18-25.
- Wu, J, Putnam-Evans, C and Bricker, TM (1996) Site-directed mutagenesis of the CP47 protein of photosystem II: 167W in the lumenally exposed loop C is required for photosystem II assembly and stability. *Plant Mol Biol* 32(3):537-542
- Yalovsky, S, Paulsen, H, Michaeli, D, Chitnis, PR and Nechushtai, R (1992) Involvement of a chloroplast HSP70 heat shock protein in the integration of a protein (light-harvesting complex protein precursor) into the thylakoid membrane. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 5616-5619
- Yamamoto, HY and Bassi, R (1996) Carotenoids: Localization and function. In: *Oxygenic Photosynthesis: The Light Reactions* (Hersg.: Ort, DR and Yocum, CF), pp. 539-563. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
- Zerges, W, Girard-Bascou, J and Rochaix, JD (1997) Translation of the chloroplast psbC mRNA is controlled by interactions between its 5' leader and the nuclear loci TBC1 and TBC3 in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol Cell Biol* 17: 3440-3448.
- Zhang, L, Paakkarinen, V, van Wijk, KJ and Aro, EM (1999) Co-translational assembly of the D1 protein into photosystem II. *J Biol Chem* 274(23):16062-16067
- Zhang, L, Paakkarinen, V, van Wijk, KJ and Aro, EM (2000) Biogenesis of the Chloroplast-Encoded D1 Protein. Regulation of translation elongation, insertion, and assembly into photosystem II. *Plant Cell* 12(9):1769-1782
- Zheleva, D, Hankamer, B and Barber, J (1996) Heterogeneity and pigment composition of isolated photosystem II reaction centers. *Biochemistry* 35(47):15074-15079
- Zouni, A, Jordan, R, Schlodder, E, Fromme, P and Witt, HT (2000) First photosystem II crystals capable of water oxidation *Biochim Biophys Acta – Bioenergetics* Vol 1457(3): 103-105

Danksagung

Diese Arbeit entstand am Institut für Entwicklungs- und Molekularbiologie der Pflanzen unter der wissenschaftlichen Betreuung von Prof. Dr. Peter Westhoff. Für die Möglichkeit, diese Arbeit in weitgehender Selbständigkeit durchführen zu können, für sein Interesse am erfolgreichen Fortgang der Arbeit sowie für seine stete Diskussionsbereitschaft möchte ich mich herzlich bedanken.

Herrn Prof. Dr. William Martin danke ich für die Übernahme des Koreferates.

Für die sehr herzliche Aufnahme während meines Aufenthaltes in München sowie für zahlreiche biochemische Hilfestellungen und Kooperationen möchte ich mich bei Herrn PD Dr. Lutz Eichacker und Herrn Dr. Bernd Müller bedanken.

Herrn Prof. Dr. Colin Robinson und Herrn Dr. Peter Hynds danke ich für die erfolgreiche Kooperation bei der Aufklärung des HCF136-Importweges.

Bei Herrn PD Dr. Peter Jahns möchte ich mich für die intensive Unterstützung bei den physiologischen Experimenten bedanken.

Christiane Driemel und Kerstin Schult danke ich dafür, daß sie engagiert an Teilprojekten dieser Arbeit mitgewirkt haben.

Mein Dank gilt außerdem allen ehemaligen und jetzigen Mitarbeitern der Botanik IV, die dazu beigetragen haben, daß ich viel Spaß und Freude im Institut erleben konnte.

Meinen Eltern danke ich für ihre Unterstützung während des gesamten Studiums.

Im Besonderen möchte ich mich bei Katja Lennartz für viel Verständnis und ihre stets hilfreiche Unterstützung bedanken. Insbesondere dann, wenn der "Stein des Sisyphos" den Berg heruntergerollt ist, konnten mich ihre aufmunternden Worte immer wieder neu motivieren.

Mit Zustimmung des Betreuers wurden Teile dieser Arbeit veröffentlicht:

Meurer, J, Plücker, H, Kowallik, KV and Westhoff, P (1998) A nuclear-encoded protein of prokaryotic origin is essential for the stability of photosystem II in *Arabidopsis thaliana*. EMBO J. 17: 5286-5297

Hynds, PJ, Plücker, H, Westhoff, P and Robinson, C (2000) Different lumen-targeting pathways for nuclear-encoded versus cyanobacterial/plastid-encoded HCF136 proteins. FEBS Lett. 467: 97-100

Eidesstattliche Erklärung:

Hiermit versichere ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt habe.

Henning Plücker

Düsseldorf, November 2000