

**Die Rolle von nukleären Hilfsfaktoren
bei der Biogenese des Cytochrom b_6f -Komplexes
in *Arabidopsis thaliana***

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

vorgelegt von
Katja Lennartz
aus Heinsberg
2000

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

1. Berichterstatter: Prof. Dr. P. Westhoff

2. Berichterstatter: PD Dr. T. Lisowsky

Tag der mündlichen Prüfung: 14.12.2000

Abkürzungen

α - ³² P-dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat, am α -P-Atom radioaktiv markiert
A	Ampere
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BAM	Benzamidin
BSA	Rinderserumalbumin
bp	Basenpaare
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Ci	Curie
Cytb ₆	Cytochrom b ₆
Cyt b ₆ f	Cytochrom b ₆ f-Komplex
Cyt f	Cytochrom f
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
DTE	Dithioerythrit
DTT	Dithiothreitol
dTTP	2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat
EDTA	Ethylendiamin- <i>N,N,N',N'</i> -tetraessigsäure
EGTA	1,2-Bis-2(aminoethoxyethan)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraessigsäure
FNR	Ferredoxin-NADP-Oxidoreduktase
g	Erdbeschleunigung
h	Stunde
hcf	Hochchlorophyllfluoreszenz
<i>hcf</i>	Bezeichnung der Mutante
<i>HCF</i>	Bezeichnung des Gens
HCF	Bezeichnung des Genprodukts
HEPES	<i>n</i> -2-Hydroxyethyl-piperazin- <i>n</i> -2-ethansulfonsäure
J	Joule
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LB	linke Grenze der T-DNA
Ler	Landsberg erecta
M	Molar, mol/l
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure
min	Minute
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
OD	optische Dichte

P700	Chlorophyll a des Reaktionszentrums I
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PS I	Photosystem I
PS II	Photosystem II
RACE	Rapid Amplification of cDNA Ends
RB	rechte Grenze der T-DNA
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkriptions-PCR
sec	Sekunde
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
T-DNA	Transfer-DNA
Tris	<i>N</i> -Tris(hydroxymethyl)-aminoethan
U	Enzymeinheiten
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
V	Volt
w/v	Gewicht pro Volumen
λ	Lambda

Inhalt

I.	Einleitung	1
I.1	Der Chloroplast – Ursprung und Funktion	1
I.2	Die plastidäre Genexpression – Kontrolle durch nukleäre Faktoren	2
I.3	Der Cytochrom b_6f -Komplex – Aufbau und Biogenese	4
I.4	Ziele dieser Arbeit	7
II.	Material und Methoden	8
II.1	Material	8
II.1.1	Chemikalien, Enzyme und Arbeitsmaterialien	8
II.1.2	Pflanzenmaterial	8
II.1.3	Bakterien- und Hefestämme	9
II.1.4	Plasmide	9
II.1.5	Sonden	9
II.1.6	cDNA-Banken	10
II.1.7	Antiseren	10
II.1.8	Primer	11
II.2	Pflanzenanzucht, Selektion von Mutanten und Segregationsanalysen	12
II.3	Molekularbiologische Methoden	12
II.3.1	Molekularbiologische Grundtechniken	12
II.3.2	Radioaktive Markierung von DNA und Hybridisierung von Nukleinsäuren	13
II.3.3	Reverse Transkriptions-PCR	13
II.3.4	cDNA-Bank-Sichtung und Isolation von cDNA-Klonen	14
II.3.5	cDNA-Vervollständigung über 5'-RACE	15
II.3.6	Klonierung von PCR-Produkten	15
II.3.7	Computerunterstützte Sequenzanalysen	15
II.4	DNA-Analysen	16
II.4.1	Isolation von DNA	16
II.4.2	Southern-Analysen	16
II.4.3	Inverse PCR	17
II.4.4	Sequenzierung von DNA	17

II.5	RNA-Analysen	18
II.5.1	Isolation von Gesamt- und Poly (A ⁺)-RNA	18
II.5.2	Northern-Analysen	18
II.6	Protein-Analysen	19
II.6.1	Proteinisolation aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	19
II.6.2	Isolierung intakter Chloroplasten aus Spinat	19
II.6.3	Fraktionierung von Spinat-Chloroplasten in Thylakoide und Hüllmembranen	20
II.6.4	Isolierung von Spinat-Thylakoiden aus intakten Chloroplasten	20
II.6.5	Salzwaschung von sonifizierten Spinat-Thylakoiden	20
II.6.6	Thermolysin-Behandlung intakter und sonifizierter Spinat-Thylakoide	21
II.6.7	Konzentrationsbestimmung von Proteinen und Chlorophyll	21
II.6.8	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	22
II.6.9	Immunotransfer-Analysen aufgetrennter Proteine	22
II.6.10	<i>In vivo</i> -Markierung von Blattproteinen und Immunopräzipitation	23
II.6.11	Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine zur Antikörpergewinnung	24
II.6.12	Expression rekombinanter Proteine in <i>E.coli</i> und Aufreinigung aus dem Periplasma	25
II.6.13	Insulin-Reduktions-Test zum Nachweis von Thioredoxin-Aktivität	26
II.7	Suche nach Interaktionspartnern mittels Sichtung einer <i>Arabidopsis</i> -cDNA-Bank im Hefe-Zweihybridsystem	26
II.8	Spektroskopische Methoden	28
II.8.1	Chlorophyll-Fluoreszenz-Induktionsanalysen an intakten <i>Arabidopsis</i> -Pflanzen	28
II.8.2	P700-Redox-Kinetiken an intakten <i>Arabidopsis</i> -Blättern	28
II.9	Komplementation von <i>hcf</i> -Mutanten von <i>Arabidopsis thaliana</i> über Agrobakterien-vermittelte Wurzeltransformation	29
III.	Ergebnisse	31
III.1	Charakterisierung der Mutanten <i>hcf153</i> und <i>hcf164</i>	31
III.1.1	In den Mutanten <i>hcf153</i> und <i>hcf164</i> ist der intersystemische Elektronentransport gestört	31
III.1.2	Die Untereinheiten des Cytochrom b ₆ f-Komplexes liegen in den Mutanten in reduzierten Mengen vor	33
III.1.3	Die Transkriptmuster der Untereinheiten des Cytochrom b ₆ f-Komplexes sind in den Mutanten nicht verändert	35
III.1.4	Die plastidär kodierten Untereinheiten des Cytochrom b ₆ f-Komplexes werden in den Mutanten synthetisiert	36

III.2	Isolierung und Verifizierung der von den Mutationen betroffenen Gene <i>HCF153</i> und <i>HCF164</i>	38
III.2.1	Die Mutationen sind jeweils mit der T-DNA Insertion gekoppelt	38
III.2.2	Isolierung der T-DNA angrenzenden genomischen Bereiche in <i>hcf153</i> und <i>hcf164</i> über inverse PCR	40
III.2.3	Isolierung der <i>HCF153</i> -cDNA über Sichtung einer <i>Arabidopsis</i> -cDNA-Bank und anschließendes 5'-RACE	40
III.2.4	Isolierung der <i>HCF164</i> -cDNA über Reverse-Transkriptions-PCR	42
III.2.5	Die Mutationen in <i>hcf153</i> und <i>hcf164</i> werden durch die Transformation mit der jeweiligen cDNA komplementiert	43
III.2.6	Die T-DNA-Insertion in der Mutante <i>hcf153</i> führt zu einem veränderten Transkript des Gens <i>HCF153</i>	44
III.2.7	Die T-DNA-Insertion in der Mutante <i>hcf164</i> unterbindet die Expression des Gens <i>HCF164</i>	46
III.3	Charakterisierung und Funktionsanalyse der Faktoren HCF153 und HCF164	47
III.3.1	Analyse des Faktors HCF153	47
III.3.1.1	<i>HCF153</i> kodiert ein bislang unbekanntes Protein	47
III.3.1.2	Suche nach Interaktoren zu HCF153 im Hefe-Zweihybridsystem	48
III.3.1.3	Untersuchungen zur Lokalisation des HCF153-Proteins	49
III.3.2	Analyse des Faktors HCF164	50
III.3.2.1	<i>HCF164</i> kodiert ein Thioredoxin-ähnliches Protein	50
III.3.2.2	Rekombinantes HCF164-Protein besitzt Disulfid-Reduktase-Aktivität <i>in vitro</i>	53
III.3.2.3	Suche nach Interaktoren zu HCF164 im Hefe-Zweihybridsystem	54
III.3.2.4	HCF164 ist ein Thylakoidmembranprotein, dessen hydrophiler C-terminaler Teil ins Lumen ragt	55
IV.	Diskussion	58
IV.1	Die Mutanten <i>hcf153</i> und <i>hcf164</i> von <i>Arabidopsis thaliana</i> sind spezifisch im Cytochrom b_6f -Komplex betroffen	58
IV.2	Welche Rolle spielt HCF153 bei der Biogenese des Cytochrom b_6f -Komplexes?	61
IV.3	Die Rolle von HCF164 bei der Reifung von Cytochrom f	64
V.	Zusammenfassung	69
VI.	Literatur	70

I. Einleitung

I.1 Der Chloroplast – Ursprung und Funktion

Die Chloroplasten sind die photosynthetischen Organellen der grünen Algen und der höheren Pflanzen. Sie stammen von kleinen undifferenzierten Proplastiden ab, die in den meisten Fällen maternell vererbt werden (Kirk und Tilney-Bassett, 1978). In differenzierenden Blattzellen entwickeln sich die Proplastiden unter Lichteinfluß zu Chloroplasten. Demgegenüber entstehen im Dunkeln unpigmentierte Etioplasten. Die Proplastiden entwickeln sich aber auch zu Amyloplasten, die Stärke speichern und sich hauptsächlich in den Wurzeln befinden, oder aber sie differenzieren zu Chromoplasten, die man vornehmlich in Blüten und Früchten findet (Thomson, 1980).

Von den verschiedenen Plastidentypen sind die Chloroplasten mit ihrer komplexen Struktur am eingehendsten untersucht. Sie sind nach außen durch eine doppelte Hüllmembran begrenzt, die das Stroma umschließt. Im Stroma liegt ein weiteres Membransystem, die Thylakoide, die das Thylakoidlumen umschließen. Sie liegen entweder als Granathylakoide gestapelt oder ungestapelt als Stromathylakoide vor (de Boer und Weisbeek, 1991).

Die Chloroplasten spielen im Stoffwechsel der Pflanze eine zentrale Rolle. In ihnen läuft die Photosynthese ab, wobei Lichtenergie in chemische Energie umgewandelt wird und CO₂ aus der Luft zu Kohlenhydraten reduziert wird. Während die Dunkelreaktionen im Stroma stattfinden, sind die vier an der Lichtreaktion beteiligten Komplexe in der Thylakoidmembran verankert. Es handelt sich dabei um das Photosystem II, den Cytochrom b₆f-Komplex, das Photosystem I und die ATP-Synthase (Cohen *et al.*, 1995). Sie bewerkstelligen die Lichtabsorption, die Wasserspaltung sowie den photosynthetischen Elektronentransport und sind entsprechend ihrer Funktion entlang der Thylakoidmembran verteilt (Anderson, 1986). Während man das Photosystem II zusammen mit dem Lichtsammelkomplex hauptsächlich in den Granabereichen vorfindet, sind das Photosystem I und die ATP-Synthase vorwiegend in den Stromathylakoiden lokalisiert. Der Cytochrom b₆f-Komplex ist gleichmäßig über beide Bereiche verteilt.

Chloroplasten sind semiautonome Zellorganellen, die nach der Endosymbiontentheorie der Organellenentwicklung cyanobakteriellen Ursprungs sind (Mereschkowsky, 1905). Sie entstanden durch die Aufnahme eines cyanobakterienähnlichen Prokaryonten durch einen eukaryontischen Einzeller (Gray, 1993; Martin *et al.*, 1998). Im Laufe der Evolution ging einerseits ein Teil der genetischen Information des Endosymbionten verloren, weil diese Gene in der Wirtszelle nicht mehr erforderlich waren oder aber funktionell durch Kerngene ersetzt wurden, auf der anderen Seite wurde ein Großteil der Gene des Protoplastiden in den Zellkern transferiert (Martin und Herrmann, 1998). Dies erklärt, warum das Plastidengenom nur etwa 120 Gene umfaßt, während das Genom der Cyanobakterien rund 3000 Gene beinhaltet. Die im Plastom verbliebenen Gene kodieren in der Hauptsache

Strukturkomponenten der photosynthetischen Komplexe und Elemente des plastidären Transkriptions- und Translationsapparates (Sugiura, 1992).

I.2 Die plastidäre Genexpression – Kontrolle durch nukleäre Faktoren

Da die Komplexe des Photosyntheseapparates sowohl aus plastidär als auch aus nukleär kodierten Untereinheiten bestehen (Herrmann *et al.*, 1985; Erickson und Rochaix, 1992), ist für die Biogenese des Chloroplasten die Koordination der Genexpression in Kern und Plastide unerlässlich (Mullet, 1988; Gruissem, 1989; Goldschmidt-Clermont, 1998). Eine große Zahl nukleär kodierter Faktoren ist für diese Koordination zuständig (Taylor, 1989). Für die Identifizierung und Untersuchung dieser Faktoren ist vor allem die Erzeugung und Analyse nukleärer Photosynthesemutanten sehr hilfreich. Phänotypisch sind die Mutanten an einer erhöhten Chlorophyllfluoreszenz (hcf: high chlorophyll fluorescence) erkennbar. Die eingefangene Lichtenergie kann nicht vollständig genutzt werden, so daß die überschüssige Energie als erhöhte Fluoreszenz abgegeben wird. Dies ist unter UV-Licht am roten Aufleuchten der Blätter zu beobachten (Miles, 1982 und 1994). Die Mutanten können Defekte im Photosystem II, im Photosystem I, im Cytochrom b_6f -Komplex oder in mehreren dieser Komplexe gleichzeitig aufweisen (Barkan *et al.*, 1986; Somerville, 1986; Meurer *et al.*, 1996). Die Charakterisierung dieser Mutanten gewährt Einblicke in die auf den verschiedenen Ebenen der Genexpression ablaufenden Regulationsmechanismen. Außerdem können mit Hilfe der Mutanten die entsprechenden Biogenesefaktoren identifiziert werden. Von großem Vorteil ist in diesem Zusammenhang der Einsatz von Insertionsmutanten. Dabei bieten sich einerseits Mutanten von *Arabidopsis thaliana*, die mittels T-DNA-Insertionsmutagenese hergestellt wurden (z.B. Koncz *et al.*, 1990, 1992; Feldmann, 1991; Bechtold *et al.*, 1993), und andererseits Mutanten von Mais, die durch Transposon-Mutagenese gewonnen wurden (z.B. Barkan, 1993; Barkan *et al.*, 1995), an.

Bei der Biogenese der photosynthetischen Komplexe werden vielschichtige Prozesse durchlaufen. Zunächst einmal müssen die verschiedenen Untereinheiten und die entsprechenden Cofaktoren synthetisiert werden. Dabei kann die plastidäre Genexpression auf verschiedenen Ebenen reguliert werden (Rochaix, 1997; Wollman *et al.*, 1999). Die Expressionskontrolle kann bei der Transkription, auf posttranskriptioneller Ebene bei der RNA-Prozessierung und RNA-Stabilität, bei der Translation oder auf posttranslationaler Ebene bei der Proteinreifung und Proteinstabilität stattfinden. Schließlich müssen die synthetisierten Untereinheiten zu ihrem Zielort transportiert und dort zu einem funktionsfähigen Komplex assembliert werden.

Die Transkription der plastidären Gene erfolgt durch zwei verschiedene RNA-Polymerasen. So findet man in den Plastiden eine RNA-Polymerase, deren plastidär kodierte Untereinheiten den α -, β - und β' -Untereinheiten der eubakteriellen RNA-Polymerase sehr ähnlich sind (Sijben-Müller *et al.*, 1986; Ohme *et al.*, 1986; Igloi und Kössel, 1992).

Außerdem hat man im Plastom Promotorsequenzen identifiziert, die mit ihren konservierten –35- und –10-Regionen prokaryotischen Promotoren gleichen, die von Sigma-artigen Transkriptionsfaktoren angesteuert werden (Hanley-Bowdoin und Chua, 1987). Dazu passend wurden im Kerngenom Sigma-Faktoren identifiziert (Isono *et al.*, 1997; Tanaka *et al.*, 1997), die diese Promotoren zusammen mit der plastidär kodierten RNA-Polymerase ansteuern könnten. Während diese prokaryotenähnliche RNA-Polymerase hauptsächlich für die Transkription der Photosynthesegene sorgt, werden die Gene für die Transkriptions- und Translationsapparate vor allem von einer zweiten RNA-Polymerase, die nukleär kodiert ist, transkribiert (Hajdukiewicz *et al.*, 1997; Stern *et al.*, 1997). Diese zweite RNA-Polymerase ist aus Spinat als 110 kDa-Protein isoliert worden (Lerbs-Mache, 1993).

Während der lichtabhängigen Chloroplastenentwicklung bleiben die Transkriptionsraten vieler plastidärer Gene konstant, wogegen sich die Spiegel der entsprechenden mRNAs stark unterscheiden (Deng *et al.*, 1987). So findet man beim Vergleich von etiolierten und ergrüntem Blättern trotz gleicher Transkriptionsraten eine unterschiedliche RNA-Akkumulation (Deng und Gruissem, 1987; Mullet und Klein, 1987). Dies zeigt, daß den posttranskriptionellen Prozessen bei der Regulation der Genexpression eine wichtige Rolle zukommt. Da viele plastidäre Gene in polycistronischen Transkriptionseinheiten abgelesen werden, ist es zunächst einmal erforderlich, daß das oftmals sehr lange Primärtranskript durch eine Reihe von endonukleolytischen Schnitten in mono- oder oligocistronische Transkripte zerlegt wird. Dabei entstehen dann sehr komplexe Transkriptmuster. Sehr ausführlich ist in diesem Zusammenhang das *psbB*-Operon untersucht worden, in welchem sowohl Gene für PS II-Untereinheiten als auch für Komponenten des Cytochrom b_6/f -Komplexes gemeinsam abgelesen werden (Barkan, 1988; Westhoff und Herrmann, 1988; Felder, 1999).

Für die Stabilität der einzelnen mRNAs sind Prozessierungen am 3'- und am 5'-Ende von Bedeutung. So dient die Interaktion nukleär kodierter RNA-Bindeproteine mit dem 5'-untranslatierten Bereich zur Erhöhung der RNA-Stabilität (Nickelsen *et al.*, 1994; Drager *et al.*, 1998). Umgekehrte Sequenzwiederholungen im 3'-untranslatierten Bereich führen zur Ausbildung von Bäumchenstrukturen, die gemeinsam mit der Anbindung spezifischer Proteine ebenfalls zur RNA-Stabilität beitragen (Stern *et al.*, 1989; Schuster und Gruissem, 1991). Demgegenüber dient die Anhängung einer Poly A-Sequenz an das 3'-Ende als Signal zum Abbau der entsprechenden RNA (Kudla *et al.*, 1996).

Da eine Reihe plastidärer Gene durch Introns unterbrochen ist, stellt das Intronspleißen ebenfalls einen wichtigen posttranskriptionellen Mechanismus dar. Dabei sind auf jeden Fall nukleäre Faktoren und vermutlich auch plastidäre Faktoren für den erfolgreichen Spleißprozeß unerlässlich (Jenkins *et al.*, 1997; Hess *et al.*, 1994).

Eine weitere posttranskriptionelle Modifikation der plastidären Transkripte erfolgt durch die RNA-Edierung. Dabei wird an spezifischen Stellen in der RNA-Sequenz die Base Cytosin gegen Uracil ausgetauscht, was zum Beispiel zur Bildung eines Translationsinitiationscodons oder aber auch zur Bildung eines Stopcodons führen kann (Maier *et al.*, 1995).

Neben diesen vielfältigen posttranskriptionellen Prozessen kommt aber auch der Translation eine wichtige Bedeutung bei der Regulation der plastidären Genexpression zu. Eine ganze Reihe nukleärer Faktoren werden für die Translation spezifischer plastidärer mRNAs benötigt (zusammengefaßt in Barkan und Goldschmidt-Clermont, 2000). Dabei ist für die Translationsinitiation wohl vor allem die Interaktion bestimmter RNA-Bindeproteine mit dem 5'-untranslatierten Bereich entscheidend (Danon und Mayfield, 1991; Mayfield, 1994; Zerges und Rochaix, 1994).

Die synthetisierten Proteine müssen dann zu ihrem jeweiligen Bestimmungsort innerhalb des Chloroplasten gelangen. Für den Transport ins Thylakoidlumen stehen zwei verschiedene Transportsysteme zur Verfügung: der Δ pH-abhängige Tat-Mechanismus und der ATP-abhängige Sec-Weg (Robinson *et al.*, 1998). Für die Insertion in die Thylakoidmembran existieren ebenfalls zwei verschiedene Möglichkeiten: einerseits können die Proteine über den GTP-abhängigen SRP-Weg eingefügt werden und andererseits gibt es auch den Mechanismus der spontanen Insertion in dieses Membransystem (Robinson und Mant, 1997).

Schließlich sind für viele Proteine weitere Modifizierungen wie z.B. der Einbau von Cofaktoren sowie spezifische Faltungen notwendig, wobei eine Reihe von Hilfsfaktoren gebraucht werden (Wollman *et al.*, 1999). Diese Modifizierungen laufen bei den meisten Proteinen nach, bei einigen Proteinen aber auch vor dem Transport zum Zielort ab. Dort müssen dann die gewonnenen Untereinheiten koordiniert zu hochmolekularen Komplexen assembliert werden, so daß sie schließlich einen funktionsfähigen Photosyntheseapparat bilden.

I. 3 Der Cytochrom b_6f -Komplex – Aufbau und Biogenese

Der Cytochrom b_6f -Komplex nimmt eine zentrale Stellung beim photosynthetischen Elektronentransport ein. Er arbeitet als Plastochinol-Plastocyanin-Oxidoreduktase und schafft so beim linearen Elektronentransport die Verbindung zwischen Photosystem II und Photosystem I. Er hat außerdem Bedeutung für den zyklischen Elektronentransport und ist an der Protonentranslokation vom Stroma ins Lumen beteiligt, womit er zur ATP-Synthese beiträgt (Gray, 1992; Malkin, 1992; Hauska *et al.*, 1996). Der Cytochrom b_6f -Komplex befindet sich in der Thylakoidmembran und ist gleichmäßig über Grana- und Stromathylakoide verteilt (Anderson, 1992). Der Komplex enthält vier höhermolekulare Untereinheiten: Cytochrom f (33 kDa) mit einer Häm c-Gruppe, Cytochrom b_6 (23 kDa) mit zwei Häm b-Gruppen, das Rieske-FeS-Protein (20 kDa) mit einem $[2Fe_2S]$ -Zentrum und die Untereinheit PetD (17 kDa), die keine prosthetische Gruppe trägt. Letztere drei Untereinheiten sind an der Anbindung von Plastochinol an den Komplex beteiligt (Cramer *et al.*, 1996). Cytochrom f katalysiert den Elektronentransfer vom Eisen-Schwefel-Zentrum des

Rieske-FeS-Proteins zum Kupfer-Zentrum des Plastocyanins auf der luminalen Seite der Thylakoidmembran (Gray, 1992).

Cytochrom f, Cytochrom b_6 und PetD werden von den plastidären Genen *petA*, *petB* bzw. *petD* kodiert, während das Rieske-FeS-Protein das Genprodukt des nukleären Gens *PetC* darstellt (Cramer *et al.*, 1996). *PetA* wird zusammen mit dem ORF 231 cotranskribiert (Willey und Gray, 1990). Die Gene *petB* und *petD* sind zusammen mit den PS II-Genen *psbB*, *psbT* und *psbH* im *psbB*-Operon organisiert (Westhoff und Herrmann, 1988).

Der Cytochrom b_6f -Komplex besitzt außerdem vier kleine Untereinheiten mit einer Größe von ca. 3-4 kDa: die drei plastidär kodierten Untereinheiten PetG (Haley und Bogorad, 1989), PetL (Takahashi *et al.*, 1996) und PetN (Hager *et al.*, 1999) sowie die nukleär kodierte Untereinheit PetM (Pierre und Popot, 1993; de Vitry *et al.*, 1996). Diese Untereinheiten sind alle hydrophob und durchspannen die Thylakoidmembran mit einer einzelnen Transmembranhelix. Ihre genaue Funktion innerhalb des Cytochrom b_6f -Komplexes ist bislang noch nicht bekannt.

Innerhalb des Cytochrom b_6f -Komplexes kommen alle acht Untereinheiten in einer 1:1-Stöchiometrie vor. Kristallisationsstudien und biochemische Analysen haben gezeigt, daß der Komplex als Dimer vorliegt, wobei noch nicht geklärt wurde, in welchem Zusammenhang dies mit seiner Funktionsweise steht. (Zusammengefaßt in Wollman *et al.*, 1999)

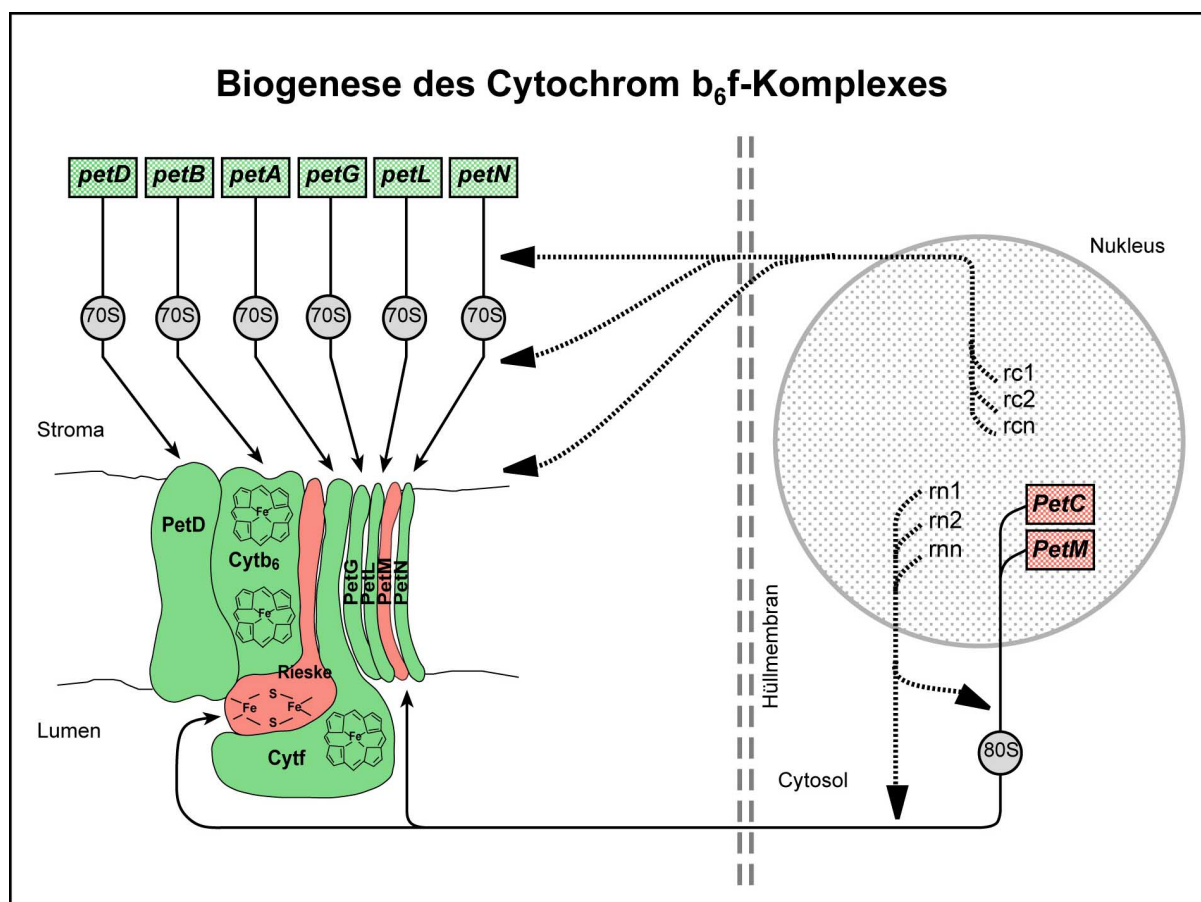


Abb. 1: Schematische Darstellung des Cytochrom b_6f -Komplexes und der Regulation der plastidären und nukleären Genexpression durch kernkodierte Faktoren.

Aufgrund der Zusammensetzung des Cytochrom b_6f -Komplexes aus nukleär und plastidär kodierten Untereinheiten erfordert seine Biogenese die koordinierte Genexpression in Kern und Plastide (Abb. 1).

Nukleäre Mutanten, die einen Defekt im Cytochrom b_6f -Komplex aufweisen, dienen dazu, solche Kernfaktoren zu identifizieren, die die Genexpression kontrollieren oder aber für die notwendige Modifizierung, den Transport zum Bestimmungsort und die Assemblierung der einzelnen Untereinheiten sorgen.

Für die meisten Ebenen der Regulation konnten bereits Kernfaktoren ausfindig gemacht werden. An nukleären Mutanten von Mais, die einen Defekt sowohl im Cytochrom b_6f -Komplex als auch im PS I aufweisen, wurde die Bedeutung von Kernfaktoren bei der Prozessierung der entsprechenden polycistronischen Transkriptionseinheiten gezeigt. So ist zum Beispiel bei einer dieser Mutanten der Defekt im Cytochrom b_6f -Komplex darauf zurückzuführen, daß die aus dem *psbB*-Operon stammenden monocistronischen mRNAs für *petB* und *petD* fehlen, während ihre polycistronischen Vorläufer vorhanden sind (Barkan *et al.*, 1986 und 1994; Fisk *et al.*, 1999).

Ebenso konnte bei zwei Mutanten gezeigt werden, daß nukleäre Genprodukte für das Spleißen von Gruppe II-Introns u.a. aus den *petB*- und *petD*-mRNAs in Mais-Chloroplasten notwendig sind (Jenkins *et al.*, 1997).

Daß Kernfaktoren eine Rolle bei der RNA-Stabilität spielen, wurde an nukleären Mutanten von *Chlamydomonas reinhardtii* mit Defekten im Cytochrom b_6f -Komplex nachgewiesen (Gumpel *et al.*, 1995). Sie zeigten eine stark reduzierte Akkumulation der Transkripte von *petA* bzw. *petB*.

Ein Defekt in der Translation der plastidären *petA*- und *petD*-mRNAs in einer nukleären Mutante von Mais wird durch das Fehlen des Biogenesefaktors CRP1 verursacht, der gleichzeitig auch noch für die Prozessierung der *petD*-mRNA notwendig ist (Barkan *et al.*, 1994; Fisk *et al.*, 1999).

Auch an der Reifung der einzelnen Untereinheiten des Cytochrom b_6f -Komplexes sind kernkodierte Biogenesefaktoren beteiligt. So konnte bei Mutanten von *Chlamydomonas reinhardtii*, bei denen spezifisch der Einbau der Häm-Gruppen entweder bei Cytochrom b_6 oder bei Cytochrom f gestört ist, gezeigt werden, daß für die Anbindung der b-Häme mindestens vier (CCB1-4) und für die Anbindung des c-Häms ebenfalls mindestens vier nukleäre Faktoren (CCS1-4) benötigt werden (Kuras *et al.*, 1997; Xie *et al.*, 1998).

An Mutanten von *Lemna perpusilla*, *Chlamydomonas reinhardtii* und Mais wurde gezeigt, daß das Fehlen einer einzelnen Untereinheit des Cytochrom b_6f -Komplexes zu einer verminderten Proteinstabilität der übrigen Untereinheiten führt. Außerdem scheinen für einen korrekten Assemblierungsvorgang alle Untereinheiten erforderlich zu sein (Barkan *et al.*, 1986; Bruce und Malkin, 1991; Kuras und Wollman, 1994; Berthold *et al.*, 1995).

Die aufgeführten Beispiele machen deutlich, daß es sich bei der Biogenese des Cytochrom b_6f -Komplexes um einen sehr komplexen Vorgang handelt, der durch eine Vielzahl nukleärer Biogenesefaktoren unterstützt und reguliert wird.

I.4 Ziele dieser Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollte das Bild der Biogenese des Cytochrom b_6f -Komplexes weiter vervollständigt werden. Dazu wurde ein genetischer Ansatz gewählt, bei dem mit *hcf*-Mutanten der genetischen Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* gearbeitet wurde. Diese Mutanten waren durch T-DNA-Insertionsmutagenese hergestellt worden und boten damit den Vorteil, daß die Isolation der betroffenen Gene wesentlich vereinfacht werden konnte. Zur Untersuchung der Biogenese des Cytochrom b_6f -Komplexes standen die beiden nukleären Photosynthesemutanten *hcf153* und *hcf164* zur Verfügung.

Ziel der hier vorgestellten Arbeiten war auf der einen Seite eine ausführliche Charakterisierung der Mutanten *hcf153* und *hcf164*, um zu zeigen, daß bei ihnen spezifisch der Cytochrom b_6f -Komplex betroffen ist und um zu ermitteln, auf welcher Ebene der Genexpression der Defekt anzusiedeln ist. Des weiteren sollten die korrespondierenden cDNAs der betroffenen Gene *HCF153* und *HCF164* isoliert und ihre Identität mittels Komplementations-Studien bestätigt werden. Durch bioinformatische und biochemische Analysen der identifizierten Faktoren sollte schließlich ihre Funktion bei der Biogenese des Cytochrom b_6f -Komplexes weiter eingegrenzt werden.

II. Material und Methoden

II.1 Material

II.1.1 Chemikalien und Enzyme

Die verwendeten Chemikalien hatten in der Regel p.a.-Qualität und wurden von den Firmen Difco (Detroit, USA), Duchefa (Haarlem, Niederlande), Fluka (Buchs, Schweiz), Gibco BRL Life Technologies (Eggenstein), Janssen (Beerse, Belgien), Merck (Darmstadt), Riedel-de-Haen (Seelze), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma-Aldrich (München) bezogen. Radioaktive Nukleotide und [³⁵S]-Methionin stammten von der Firma Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden).

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

Das Herbizid Basta wurde freundlicherweise von der Firma Hoechst (Frankfurt) zur Verfügung gestellt.

II.1.2 Pflanzenmaterial

Die Mutanten *hcf153* und *hcf164* wurden aus einer T-DNA-Insertionsmutanten-Kollektion von *Arabidopsis thaliana* (Ökotyp Wassilewskija), die von Dr. G. Pelletier und Dr. N. Bechtold (Institut National de la Recherche Agronomique, Versailles, Frankreich) zur Verfügung gestellt wurde, selektiert. Dabei handelte es sich um Saatgut der dritten Transformanten-Generation T3. Die nach Selbstung erhaltene T4-Generation wurde mit dem Ökotypen Landsberg erecta rückgekreuzt. Saatgut der entsprechenden F2-Generation wurde von Dr. Karin Meierhoff (Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf) zur Verfügung gestellt und für alle beschriebenen Untersuchungen verwendet.

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

II.1.3 Bakterien- und Hefestämme

E.coli DH5 α (Bethesda Res. Lab., 1986)

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

E.coli SF110 (Meerman und Georgiou, 1994)

E.coli S17-1 (Simon, 1984)

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

E.coli SOLRTM (Stratagene, Heidelberg)

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)

II.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) bzw. pAH33 (Seidler, 1994). Für das Hefe-Zweihybridsystem wurden die Vektoren pGBT9 und pGAD10 (Clontech, Palo Alto, USA) verwendet.

II.1.5 Sonden

Sonde	Klon/Vektor	Fragment	Hersteller/Referenz
<i>petA</i> (Cyt f)	pSoP3310	<i>EcoRI/BamHI</i>	Westhoff <i>et al.</i> , 1991
<i>petB</i> (Cyt b ₆)	pSoP1094	<i>XhoI</i>	Westhoff und Herrmann, 1988
<i>petC</i> (Rieske-FeS)	39G11T7	<i>Sall/NotI</i>	ABRC, Ohio, USA
<i>petD</i> (PetD)	pSoP937	<i>XbaI</i>	Westhoff und Herrmann, 1988
T-DNA-LB	p10/1	<i>EcoRV/XhoI</i>	G. Pelletier, INRA, Versailles, Frankreich
T-DNA-RB	p10/1	<i>XbaI/EcoRI</i>	G. Pelletier, INRA, Versailles, Frankreich
cDNA- <i>HCF153</i>	pcAt-HCF153	<i>EcoRI/XhoI</i>	diese Arbeit
cDNA- <i>HCF164</i>	pcAt-HCF164	<i>BamHI</i>	diese Arbeit

Tabelle 1: Aufstellung der verwendeten Sonden für Southern- und Northern-Analysen.

II.1.6 cDNA-Banken

Zur Isolation der *HCF153*-cDNA wurde eine blattspezifische, amplifizierte cDNA-Bank von *Arabidopsis thaliana* des Ökotypen Columbia von der Universität Leiden (Niederlande) verwendet. Sie wurde mit Hilfe des Lambda-Uni-ZapTM-Synthese-Reagenziensatzes der Firma Stratagene (Heidelberg) hergestellt. Die cDNA-Fragmente wurden gerichtet in den mit *EcoRI* und *XhoI* geschnittenen Vektor pBluescript SK (-) inseriert.

Für die Untersuchungen mit dem Hefe-Zweihybridsystem wurde eine bei der Firma Clontech (Palo Alto, USA) kommerziell erhältliche cDNA-Bank von *Arabidopsis thaliana* freundlicherweise von PD Dr. Thomas Lisowsky (Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf) zur Verfügung gestellt. Die cDNA wurde aus mRNA aus Blattgewebe von drei Wochen alten *Arabidopsis thaliana*-Keimlingen hergestellt. Dabei wurde sowohl Oligo-dT-Primer als auch ein Gemisch an Zufalls-Hexamerprimern für die reverse Transkription eingesetzt. Nach Angaben des Herstellers enthielt die Bank mindestens 3.0×10^6 unabhängige cDNA-Klone. 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.

II.1.7 Antiseren

Antigen/Spezies	Hersteller/Referenz
Cyt f/Spinat	G. Hauska, Universität Regensburg
Cyt b ₆ /Spinat	G. Hauska, Universität Regensburg
Rieske-FeS/Spinat	R.B. Klösgen, Universität Halle-Wittenberg
PetD/Spinat	R.J. Berzborn, Ruhr-Universität Bochum
PsaA/B (PS I-I)/Spinat	N. Nelson, Universität Tel Aviv, Israel
PsaD (PS I-II)/Spinat	R. Nechushtai, Hebrew University, Jerusalem, Israel
CP47 (PsbB)/Spinat	U. Johannigmeier, Universität Bochum
D2 (PsbD)/Gerste	J. Mullet, Texas A&M-University, USA
Cyt b ₅₅₉ (PsbE)/Spinat	B.A. Andersson, Universität Stockholm, Schweden
23-kDa-Protein (PsbP)/ Spinat	R.B. Klösgen, Universität Halle-Wittenberg
34-kDa-Protein (PsbO)/ Spinat	R.B. Klösgen, Universität Halle-Wittenberg
FNR/ Spinat	R.B. Klösgen, Universität Halle-Wittenberg
HCF153/Arabidopsis	diese Arbeit
HCF164/Arabidopsis	diese Arbeit

Tabelle 2: Aufstellung der verwendeten Antiseren.

II.1.8 Primer

Name	Sequenz (5'-3')	Verwendung
LB TAG 5	CTACAAATTGCCTTTTCTTATCGA	Inverse PCR
LB TAG 11	CACAACAGACAATCGGCTGCTCTG	Inverse PCR
LB TAG 13	TTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTG	Inverse PCR
LB TAG 14	GGTAATAGGACACTGGGATTCTGTC	Inverse PCR
LB TAG 17	GTCCGCTCTACCGAAAAGTTACG	Inverse PCR
LB TAG 18	CGACAACATGTGCGAGGCTCAGC	Inverse PCR
At153-2	ATCTTCGTCGAGTTTGTCTAGCGA	5'-RACE, Sequenzierung
At153-2A	CGCTGACAAACTCGACGAAGAT	5'-RACE, Sequenzierung
At153-3	GGCGATAAGAGTAGCAGGAATGG	5'-RACE, Sequenzierung
At153AK-F	CGGAATTCCATGGCGAGACTTTTCGTC (<i>EcoRI</i>)	Expressionsklonierung
At153AK-R	CCGCTCGAGACGTTTAGGCCGGTTACG (<i>XhoI</i>)	Expressionsklonierung
At164-F	GCGGATCCCGACGATGGCTCGCTTAG (<i>BamHI</i>)	RT-PCR
At164-R	CGGATCCGCATGATAGTGATGCCACTC (<i>BamHI</i>)	RT-PCR
At164EX-H2	CGGAATTCCGGATTCCCTGAATCTCCC (<i>EcoRI</i>)	Expressionsklonierung
At164EX-H5	AGGATTGCTAGCGATTTTGGGATTCTTTGAAGG (<i>NheI</i>)	Expressionsklonierung
At164EX-R	CCGCTCGAGTCCATGGCTTAAGGGATCAG (<i>XhoI</i>)	Expressionsklonierung
At164EX-R2	TACTCAAGCTTATCCATGGCTTAAGGGATC (<i>HindIII</i>)	Expressionsklonierung
SMART-Oligo	AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGTACGCGGG	5'-RACE
SMART-Primer	AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGT	5'-RACE
T3	ATTAACCCTCACTAAAG	Sequenzierung
T7	AATACGACTCACTATAG	Sequenzierung

Tabelle 3: Aufstellung der verwendeten Primer. Die aufgelisteten Primer wurden durch die Firmen Birsner und Grob Biotech GmbH (Denzlingen) und Gibco BRL (Eggenstein) synthetisiert, die Primer T3 und T7 wurden von Stratagene (Heidelberg) sowie SMART-Primer und SMART-Oligo von Clontech (Palo Alto, USA) bezogen. Die enthaltenen Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen.

II.2 Pflanzenanzucht, Selektion von Mutanten und Segregationsanalysen

Die *Arabidopsis*-Pflanzen wurden auf Floratonl-Komposterde (Floragard, Oldenburg) in einer Anzuchtkammer bei 23 °C in einem Tag/Nacht-Rhythmus von 16/8 h bei einer Beleuchtung von 80 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ angezogen (Leuchtstoffröhren Fluora L58W/77 und Natura de Luxe L58W/76, Osram, Berlin). Für die Samenproduktion erfolgte die Pflanzenanzucht im Arasystem (BetaTech, Gent, Belgien).

Für die sterile Anzucht wurde das Saatgut oberflächensterilisiert und auf 1/2 MS-Medium (Murashige und Skoog, 1962) mit 1 % (w/v) Saccharose, 2.5 mM MES/NaOH pH 5.7 und 0.3 % (w/v) Gelrite in Plastikpetrischalen ausgesät. Zur Selektion von herbizidresistenten Pflanzen wurde dem Medium 10 mg/l Basta zugefügt. Zur Synchronisation der Keimung wurde die Aussaat 48 h bei 4 °C im Dunkeln belassen. Die Pflanzen wurden in einem Anzuchtschrank bei 23 °C in einem Tag/Nacht-Rhythmus von 16/8 h bei einer Beleuchtung von 40-70 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (Lumilux L36W/11-Tageslichtröhren, Osram, Berlin) bzw. 2-5 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (Schwachlichtbedingungen) angezogen. Die Sichtung der Mutanten erfolgte mit einer UV-Handlampe (Fluotest Forte 180 W, Heraeus, Hanau) bei 360 nm nach 5-12 Tagen. Zum Nachweis der Kopplung von T-DNA und Mutation wurden Segregationsanalysen der durch die T-DNA vermittelten Basta-Resistenz und der Mutation durchgeführt. Die Auszählung der resistenten und mutanten Pflanzen fand auf Selektionsmedium statt.

II.3 Molekularbiologische Methoden

II.3.1 Molekularbiologische Grundtechniken

Phenol/Chloroform-Extraktionen, Präzipitationen, gelelektrophoretische Auftrennung und Anfärbung von Nukleinsäuren richteten sich, falls nicht anders erwähnt nach Standardprotokollen (Sambrook *et al.*, 1989).

Für die Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde der JetSorb-Reagenziensatz (Genomed, Bad Oeynhausen) verwendet.

Restriktionen und Ligationen von DNA-Fragmenten wurden nach den Angaben der Enzym-Hersteller durchgeführt.

Transformationen gefrierkompetenter Bakterien erfolgten mittels Hitzeschock (Hanahan, 1985) sowie Transformationen elektrokompeter Bakterien mittels Elektroporation im Electro Cell Manipulator 600 (ITC Biotechnology, Heidelberg) nach Herstellerangaben.

Die Isolierung von Plasmid-DNA im Minimaßstab wurde mittels Kochlyse (Holmes und Quigley, 1981) durchgeführt, im größeren Maßstab erfolgte sie entsprechend der Methode der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979) mittels JetStar-Säulen (Genomed, Bad Oeynhausen) nach Herstellerangaben.

II.3.2 Radioaktive Markierung von DNA und Hybridisierung von Nukleinsäuren

Für die radioaktive Markierung wurden aufgereinigte Restriktions- oder PCR-Fragmente verwendet. Sie wurden nach dem Prinzip des Zufalls-Starts (Feinberg und Vogelstein, 1983) mit dem Megaprime Labeling Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) markiert. Die Markierung erfolgte nach Herstellerangaben, allerdings in einem reduzierten Reaktionsansatz mit 10 ng Sonden-DNA und 10-20 μCi $\alpha^{32}\text{P}$ -dATP (Aktivität 3000 Ci/mmol). Die Hybridisierung der jeweiligen Filter wurde für 18 h bei 64 °C in 250 mM Na_2HPO_4 pH 7.2, 7 % (w/v) SDS, 2.5 mM EDTA durchgeführt. Danach wurde jeweils 45 min mit 2.5 x SSC, 1 x SSC, 0.5 x SSC und 0.2 x SSC und je 1 % (w/v) SDS sowie mit 0.1 x SSC und 0.5 % (w/v) SDS gewaschen (1 x SSC: 150 mM NaCl, 16.5 mM Natriumcitrat pH 7.0). Die Membranen wurden in Frischhaltefolie eingeschlagen und bei -70 °C auf einem Röntgenfilm (CEA Wicor-X RP oder Kodak X-Omat AR5) mit der Verstärkerfolie Cronex Quanta III (Du Pont, USA) 3-7 Tage exponiert.

II.3.3 Reverse Transkriptions-PCR

Für die Erststrangsynthese wurden 500 ng Poly A⁺-RNA mit 2 μl Oligo dT₁₈-Primer (10 μM) 10 min bei 70°C denaturiert, 2 min auf Eis abgekühlt und unter Zusatz von 0.5 mM dNTPs, 10 mM DTT im mitgelieferten Erststrangpuffer 2 min bei 42°C vorinkubiert. Dann wurden 200 U Superscript II Reverse Transkriptase zugegeben und der Ansatz 50 min bei 42°C und 15 min bei 70°C inkubiert.

Für die anschließende PCR-Amplifizierung (Faloona und Mullis, 1987; Saiki *et al.*, 1988) wurden 2 μl der so erhaltenen Erststrang-cDNA mit je 0.2 μM sequenzspezifischem 5'- und 3'-Primer, 0.2 mM dNTPs und 1 μl 50xKlenTaq-Mix (Clontech, Palo Alto, USA) im mitgelieferten Puffer in einem Gesamtvolumen von 50 μl eingesetzt. Die Reaktion wurde im Gene AmpTM PCR System 9700 (Perkin Elmer Applied Biosystems, Langen) in 25 Zyklen durchgeführt.

Es wurde folgendes Temperaturprofil gewählt:	Denaturierung	30 sec	95 °C
	Primer-Anlagerung	60 sec	60 °C
	Verlängerung	90 sec	68 °C

Dabei wurde im ersten Zyklus die Denaturierung auf 2 min und im letzten Zyklus die Verlängerung auf 3 min ausgedehnt.

II.3.4 cDNA-Bank-Sichtung und Isolation von cDNA-Klonen

Zur Sichtung von cDNA-Banken wurde nach der Methode von Benton und Davis (1977) verfahren.

Bakterien des Stammes XL1-Blue MRF' wurden in LBM-Medium (10 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Hefe-Extrakt, 10 g/l NaCl, 4 g/l Maltose, pH 7.2) angezogen, abzentrifugiert und mit 10 mM MgSO_4 auf eine OD_{600} von 0.5 eingestellt. Je 2 ml Bakteriensuspension wurden mit 1 μl Phagensuspension in SM-Medium (5.8 g/l NaCl, 2.0 g/l $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$, 6.1 g/l Tris/HCl, pH 7.5) zur Infektion 15 min bei 37 °C inkubiert. 30 ml auf 42 °C vorgewärmte NZY-Topagarose (NZY-Medium mit 8 g/l Agarose) wurde hinzugegeben und die Suspension auf den auf 42 °C vortemperierten NZY-Agarplatten verteilt. Auf sieben Platten (20 x 35 cm) wurden jeweils 120.000 pfu (plaque forming units) ausplattiert. Als Bodenagar dienten je 450 ml NZY-Agar (5 g/l NaCl, 2 g/l $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$, 5 g/l Hefe-Extrakt, 10 g/l Casein-Hydrolysat, 15 g/l Serva-Agar, pH 7.5). Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert, anschließend 1 h bei 4 °C abgekühlt und dann pro Platte zwei Nitrocellulosefilter (17 x 19 cm, Porengröße 0.45 μm , Schleicher und Schuell, Dassel) für 30 sec aufgelegt. Die Filter wurden nacheinander mit der DNA-Seite nach oben 4 min in 0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl denaturiert, 7 min in 0.5 M Tris/HCl pH 7.5, 3 M NaCl neutralisiert und 7 min in 0.25 M Na_2HPO_4 pH 7.2 äquilibriert. Dann wurden sie getrocknet und zur Fixierung der DNA 2 h bei 80 °C gebacken. Die Markierung der Sonde sowie die Hybridisierung der Filter erfolgte nach dem unter II.3.2 beschriebenen Verfahren. Positive Phagenplaques wurden zur Vereinzelung ausgestochen und in 200 μl SM-Medium mit 20 μl Chloroform zum Abtöten der Wirtsbakterien aufgenommen. Diese Suspension wurde in SM-Medium 1:1000 verdünnt und 1 μl analog zur Primärplattierung mit 200 μl XL1-Blue-Suspension 15 min bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von je 1.8 ml NZY-Topagarose wurden die Ansätze auf Petrischalen mit 20 ml NZY-Agar verteilt und wie oben beschrieben erneut gesichtet. Positive Plaques wurden ausgestochen, in 500 μl SM-Medium mit 20 μl Chloroform aufgenommen und bei 4 °C gelagert.

Zur Isolation der cDNA-Klone erfolgte die *in-vivo*-Exzision nach dem Protokoll der Firma Stratagene (Heidelberg). 200 μl XL1-Blue MRF'-Zellen mit einer OD_{600} von 1.0 in 10 mM MgSO_4 wurden mit 250 μl Phagensuspension und 1 μl ExAssistTM-Helferphagen (mindestens 10^6 pfu) 15 min bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 3 ml LB-Medium (10 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Hefe-Extrakt, 10 g/l NaCl) wurde 3 h bei 37 °C geschüttelt. Danach wurde der Ansatz 20 min auf 70 °C erhitzt und 15 min bei 1000 g abzentrifugiert. Der Überstand mit dem pBluescript-Phagemid verpackt in filamentöse Phagenpartikel wurde bei 4 °C gelagert. 200 μl SOLRTM-Zellen mit einer OD_{600} von 1.0 in 10 mM MgSO_4 wurden mit 100 μl des Überstandes 15 min bei 37 °C inkubiert. Dann wurden 50 μl und 100 μl des Ansatzes auf LB-Agarplatten mit 50 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Aus den angewachsenen Bakterien wurden die cDNA-Plasmide mittels Standardverfahren isoliert.

II.3.5 cDNA-Vervollständigung über 5'-RACE

Das Verfahren wurde aus der Vorschrift des SMART PCR cDNA Synthese-Kits (Clontech, Palo Alto, USA) abgeleitet, welches zur Herstellung von Vollängen-cDNA-Banken dient. Aus Poly (A⁺)-RNA wurden mit Hilfe eines Oligo-dT-Primers und des SMART-Oligos in einer reversen Transkription cDNAs erzeugt, die am 5'-Ende die SMART-Sequenz trugen. Dazu wurde die Superscript II Reverse Transkriptase (Gibco BRL, Eggenstein) benutzt, die hohe Ausbeuten an Vollängentranskripten erreicht. In einer PCR-Reaktion konnte anschließend mittels SMART-Primer und spezifischem 3'-Primer (ausgewählt aus dem 5'-Bereich des unvollständigen cDNA-Klons) das gesuchte 5'-Ende amplifiziert werden.

Die Erststrangsynthese erfolgte wie unter II.3.3 beschrieben, wobei der Ansatz zusätzlich 2 µl SMART-Oligo (10 µM) enthielt. Auch die anschließende PCR-Amplifizierung wurde wie bei II.3.3 durchgeführt, wobei die Primeranlagerungstemperatur aber 65 °C betrug und als 5'-Primer der SMART-Primer eingesetzt wurde. 10 µl des PCR-Ansatzes wurden auf einem 0.7 % igen Agarosegel aufgetrennt. Ein Stück der entsprechenden Produktbande wurde für die Reamplifizierung verwendet. Dabei wurde als 5'-Primer wieder der SMART-Primer und als 3'-Primer ein sequenzspezifischer innerer Primer verwendet. Die PCR-Reaktion wurde analog zur Erstamplifizierung durchgeführt.

II.3.6 Klonierung von PCR-Produkten

Zur Klonierung von PCR-Produkten wurden die Primer zumeist mit geeigneten Restriktionsschnittstellen versehen. Andernfalls wurde zur direkten Klonierung von PCR-Produkten ein T-Vektor eingesetzt. Dabei handelte es sich um *EcoRV*-geschnittene pBluescript KS II (+)-DNA (Stratagene, Heidelberg), bei der mit Hilfe der Taq-Polymerase und dTTP 3'-T-überhängende Enden erzeugt wurden (Marchuk *et al.*, 1990).

II.3.7 Computerunterstützte Sequenzanalysen

Mit Hilfe des BLAST-Servers (Basic Local Alignment Search Tool; Altschul *et al.*, 1994) des National Center for Biotechnology Information (Bethesda, USA) wurden Datenbanksuchen (GenBank, EMBL, DDBJ, PDB, SwissProt, PIR) nach ähnlichen Aminosäure- und Nukleotidsequenzen durchgeführt.

Sequenzdaten wurden mit Hilfe der Computerprogramme MacMollyTetra (Softgene GmbH, Bocholt; Schöneberg *et al.*, 1994) und Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) untersucht. Ähnlichkeitsbäume wurden mit dem Programm PAUP 4.0 erstellt.

II.4 DNA-Analysen

II.4.1 Isolation von DNA

Für die DNA-Isolation wurde das Protokoll nach Dellaporta *et al.* (1993) in folgender Weise abgewandelt: Etwa 0.5 g Blattmaterial 3 Wochen alter Pflanzen aus steriler Anzucht wurde unter flüssigem Stickstoff zermörsert, in 4 ml Lysispuffer (7 M Harnstoff, 0.3 M NaCl, 50 mM Tris/HCl pH 8.0, 1 % (w/v) N-Laurylsarkosinat, 20 mM EDTA) homogenisiert und 5 min bei 37 °C inkubiert. Nach Phenol/Chloroform-Extraktion wurden die Nukleinsäuren mit Isopropanol 1 h bei RT gefällt, einmal mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und in 500 µl TE-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 8.0, 1 mM EDTA) rückgelöst. Danach erfolgte ein RNase-Verdau mit 2 µl RNase (10 mg/ml) bei 37 °C für 45 min. Dann wurde mit Phenol/Chloroform sowie anschließend mit Chloroform extrahiert und die DNA mit 0.3 M Natriumacetat pH 6.2 und 1 Volumen Isopropanol 1 h bei RT gefällt, mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 µl 10 mM Tris/HCl pH 8.0 gelöst. Die DNA-Konzentration wurde über ein Agarosegel abgeschätzt, indem sie mit verschiedenen Konzentrationen von λ -DNA verglichen wurde.

II.4.2 Southern-Analysen

Die DNA-Proben wurden nach entsprechendem Restriktionsverdau mit 1/5 Volumen 0.25 % (w/v) Bromphenolblau, 50 % (v/v) Glycerin auf einem 0.7 % igen Agarosegel in TBE-Puffer (90 mM Tris, 90 mM Borsäure, 2.5 mM EDTA) mit Zusatz von 0.5 µg/ml Ethidiumbromid aufgetrennt. Die Elektrophorese erfolgte für 18 h bei konstanter Spannung von 35 V. Pro Proben tasche wurden bei genomischer DNA 1µg und bei Plasmid-DNA 400 ng eingesetzt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel zur Depurinierung der DNA 15 min in 0.25 M HCl und zur Denaturierung der DNA 2 x 15 min in 0.4 M NaOH, 0.6 M NaCl geschwenkt. Dann wurde die DNA über Nacht mittels Saugströmung mit 25 mM Natriumphosphat pH 6.5 auf eine Hybond N⁺-Nylonmembran (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) transferiert (Southern, 1975). Die Membran wurde getrocknet und zur Fixierung der DNA 3 h bei 80 °C gebacken. Zum Nachweis spezifischer DNA-Sequenzen wurden radioaktiv markierte DNA-Sonden eingesetzt. Die Markierung der Sonden sowie die Hybridisierung und Waschung der Filter erfolgte wie unter II.3.2 beschrieben. Um die Filter für weitere Hybridisierungen einzusetzen, wurden sie zur Entfernung der Sonden bei 37 °C 15 min in 0.1 M NaOH, 0.25 % (w/v) SDS und 2 x 15 min in 0.2 M Tris/HCl pH 7.5, 0.1 x SSC, 0.25 % (w/v) SDS stark geschüttelt.

II.4.3 Inverse PCR

Mit Hilfe der inversen PCR (Ochman *et al.*, 1988 und 1993) wurden die an die T-DNA angrenzenden Genombereiche aus den T-DNA-Insertionsmutanten isoliert. Dazu wurden 2.5 µg genomische DNA der Mutanten mit geeigneten Restriktionsenzymen nach Angaben des Herstellers inkubiert. Anschließend wurde die DNA mit Phenol/Chloroform und Chloroform extrahiert sowie mit 0.3 M Natriumacetat pH 6.2 und 3 Volumen Ethanol gefällt. Für die Selbstligation wurden 0.75 µg der restringierten DNA mit 20 U T4-DNA-Ligase (Roche Diagnostics, Mannheim) in einem Gesamtvolumen von 500 µl im mitgelieferten Puffer für 20 h bei 12 °C inkubiert. Danach wurde der Ansatz wie oben beschrieben gereinigt und gefällt. Für die PCR-Reaktion wurden in einem 20µl-Ansatz 100 ng zirkularisierte DNA mit 1 U Taq-Polymerase (QBiogene, Illkirch, Frankreich) in Anwesenheit von je 1 µM T-DNA-spezifischen, nach außen gerichteten Primern und 200µM dNTPs im mitgelieferten Puffer zusammengegeben. Die Reaktion wurde im Gene AmpTM PCR System 9700 (Perkin Elmer Applied Biosystems, Langen) in 35 Zyklen durchgeführt.

Es wurde folgendes Temperaturprofil gewählt:	Denaturierung	30 sec	94 °C
	Primer-Anlagerung	60 sec	58 °C
	Verlängerung	120 sec	72 °C

Dabei wurde im ersten Zyklus die Denaturierung auf 5 min und im letzten Zyklus die Verlängerung auf 10 min ausgedehnt. 10 µl des PCR-Ansatzes wurden auf einem 0.7 % igen Agarosegel aufgetrennt. Ein Stück der entsprechenden Produktbande wurde für die Reamplifizierung mit inneren Primern verwendet. Die PCR-Reaktion wurde analog zur Erstamplifizierung durchgeführt, allerdings in einem Gesamtvolumen von 100 µl mit 2.5 U Taq-Polymerase.

II.4.4 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierungen erfolgten nach der Didesoxy-Kettenabbruchmethode von Sanger (1977) mit Hilfe des T7-Sequenzierungs-Reagenziensatzes der Firma Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden). Pro Sequenzreaktion wurden 1.5-2 µg DNA eingesetzt. Sie wurde in 0.2 M NaOH denaturiert und durch Zugabe von 1/10 Volumen 3M Natriumacetat pH 4.8 und 2.5 Volumen Ethanol gefällt. Die Durchführung der Anlagerung der Primer und der Sequenzreaktion erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Die einzelsträngigen Reaktionsprodukte wurden auf 4- und 6 % igen Polyacrylamidgelen (Vernetzungsgrad Acrylamid/N,N-Methylbisacrylamid: 19/1) in TBE (90 mM Tris, 90 mM Borsäure, 2.5 mM EDTA) mit 8 M Harnstoff aufgetrennt. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Leistung

von 60 Watt. Anschließend wurden die Gele auf Filterpapier gezogen und im Vakuum-Geltrockner (Biorad, München) bei 80 °C 45 min getrocknet. Die Gele wurden auf einem Röntgenfilm (Wicor X-RP) über Nacht exponiert.

Ein Teil der Sequenzierarbeiten wurde von der Firma SeqLab (Göttingen) nach deren Methoden durchgeführt.

II.5 RNA-Analysen

II.5.1 Isolation von Gesamt- und Poly (A⁺)-RNA

Etwa 4 g Blattmaterial 3 Wochen alter, steril angezogener Pflanzen wurden unter flüssigem Stickstoff zermörsert und in 14 ml 50 °C warmem Homogenisationsmedium (0.33 M Sorbit, 0.2 M Tris/HCl pH 9.0, 0.3 M NaCl, 10 mM EDTA, 2 % (w/v) SDS, 10 mM DTE) mit 7 ml puffergesättigtem Phenol (0.1 M Tris/HCl pH 8.0, 0.2 % (v/v) 2-Mercaptoethanol, 0.1 % (w/v) 8-Hydroxychinolin) und 7 ml Chloroform 20 min gerührt. Zur Phasentrennung wurde 10 min bei 7000 Upm zentrifugiert. Die wäßrige Phase wurde noch je einmal mit 1 Volumen Phenol/Chloroform und 1 Volumen Chloroform extrahiert. Die Nukleinsäuren wurden über Nacht bei -20 °C mit 0.2 M Natriumacetat pH 6.0 und 1 Volumen Isopropanol gefällt und anschließend in 6 ml Borat-Puffer (80 mM Tris/Borat pH 8.0, 10 mM EDTA) gelöst. Dann wurde die hochmolekulare RNA mit 2 M LiCl über Nacht bei 4 °C selektiv gefällt, zweimal mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und in sterilem Wasser gelöst (Westhoff *et al.*, 1991).

Die Isolation von Poly (A⁺)-RNA erfolgte mittels Oligotex (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) nach dem Protokoll des Herstellers.

Die RNA-Konzentration wurde spektroskopisch anhand der Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt.

II.5.2 Northern-Analysen

Glyoxylierte Poly(A⁺)-RNA (Mc Master und Carmichael, 1977) wurde mit 1/4 Volumen 90 % (v/v) Formamid, 10 mM EDTA, 0.05 % (w/v) Bromphenolblau, 0.05 % (v/v) Xylencyanol auf einem 1.2 % igen Agarosegel in MOPS-Puffer (20 mM MOPS pH 7.0, 5 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA) aufgetrennt. Dabei wurden pro Probentasche 10 µg Poly(A⁺)-RNA aufgetragen. Als Längenstandard wurde 1 µg *Pst*I-geschnittene, glyoxylierte λ-DNA eingesetzt. Die Elektrophorese wurde für 7 h bei konstanter Spannung von 130 V bei 4 °C durchgeführt. Die RNA wurde nach der Elektrophorese über Nacht mittels Saugströmung mit 20 x SSC (3 M NaCl, 0.33 M Natriumcitrat pH 7.0) auf eine Hybond N-Membran (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) transferiert (Grüne und Westhoff, 1988). Zur Fixierung der

RNA wurde die Membran im UV-Crosslinker der Firma Amersham (Braunschweig) mit 300 J/m² UV-bestrahlt. Zum Nachweis spezifischer mRNAs wurden radioaktiv markierte DNA-Sonden verwendet. Der Längenstandard wurde mit radioaktiv markierter λ -DNA hybridisiert. Die Markierung der Sonden sowie die Hybridisierung und Waschung der Filter erfolgte wie unter II.3.2 beschrieben. Um die Filter für weitere Hybridisierungen einzusetzen, wurden sie zur Entfernung der Sonden 2 x 30 min bei 95 °C in 0.05 x SSC, 0.5 % (w/v) SDS stark geschüttelt.

II.6 Protein-Analysen

II.6.1 Proteinisolation aus *Arabidopsis thaliana*

Blattmaterial von 20 drei Wochen alten Pflanzen wurde in flüssigem Stickstoff zermörsert. Nach Zugabe von zwei Volumen eiskaltem Homogenisationspuffer (50mM Tris/HCL pH 8.0, 10 mM EDTA, 2 mM EGTA, 10 mM DTT, 1 mM Phenylmethylsulfonyl-Fluorid (PMSF), 1 mM Benzamidin (BAM)) wurde die Suspension durch Miracloth filtriert und anschließend 10 min bei 10.000 Upm zur Abtrennung der Membranen zentrifugiert. Die Membran-Fraktion wurde in 100 μ l Homogenisationspuffer resuspendiert. Die Proteine der löslichen Fraktion wurden mit 15% (w/v) Trichloressigsäure gefällt, mit 80%(v/v) Azeton gewaschen und in 100 μ l Homogenisationspuffer resuspendiert.

II.6.2 Isolierung intakter Chloroplasten aus Spinat

Spinatblätter wurden bei 4 °C in 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 sec bei voller Umdrehungszahl zerschnitten und das Homogenat anschließend durch 100 μ m Gaze und 2 Lagen Miracloth filtriert. Nach Zentrifugation für 2 min bei 6000 Upm bei 4 °C wurde das Pellet 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 8000 Upm bei 4 °C im HB4-Ausschwingrotor zentrifugiert. Die untere Bande mit den intakten Plastiden wurde geerntet, zweimal mit 330 mM Sorbit, 50 mM HEPES/KOH pH 7.8 gewaschen und in 2 ml desselben Puffers resuspendiert.

II.6.3 Fraktionierung von Spinat-Chloroplasten in Thylakoide und Hüllmembranen

Die Fraktionierung intakter Spinat-Chloroplasten in Thylakoide und Hüllmembranen erfolgte nach der Methode von Cline *et al.* (1981) über einen Saccharose-Stufengradienten. Intakte Chloroplasten entsprechend 500 µg Chlorophyll wurden durch Zentrifugation pelletiert, 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 1 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. Nach Ultrazentrifugation für 14 Stunden bei 113.000 x g bei 4 °C bandierten die Hüllmembranen im Übergang zwischen 1.2 M und 0.3 M Saccharose, während die Thylakoide pelletiert waren oder unmittelbar oberhalb des Bodens bandierten. Nach Ernten des Gradienten wurden die Thylakoide für 5 min bei 6000 Upm pelletiert, gewaschen und dann in 10 mM HEPES/KOH, pH 8.0 resuspendiert. Die Hüllmembranen wurden mit 25 % (w/v) PEG1500 für 30 min auf Eis gefällt, in der Ultrazentrifuge über Nacht bei 165.000 x g pelletiert und in 10 mM HEPES/KOH pH 8.0 resuspendiert. Zur Überprüfung der Reinheit der Hüllmembran-Fraktion wurden eine Chlorophyllbestimmung und eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt.

II.6.4 Isolierung von Spinat-Thylakoiden aus intakten Chloroplasten

Intakte Chloroplasten wurden zur osmotischen Lyse 1:20 in 10 mM HEPES/KOH pH 8.0 verdünnt und 10 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Thylakoide durch Zentrifugation für 5 min bei 6000 Upm bei 4 °C pelletiert, zweimal in je 20 Volumen Lysepuffer gewaschen und danach in Lysepuffer auf eine Konzentration von 1 mg Chlorophyll/ml eingestellt.

II.6.5 Salzwäsche von sonifizierten Spinat-Thylakoiden

Spinat-Thylakoide wurden in einer Konzentration entsprechend 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, 2 mM BAM mit dem Branson Sonifier B12 (Danbury, USA) dreimal für 15 sec bei Stufe 5 unter Eiskühlung beschallt. Dabei wurden 250 mM NaCl, 200 mM Na₂CO₃ pH 11 oder 1 M CaCl₂ dem Medium zugesetzt bzw. es wurde zur Kontrolle ohne Salzzusatz

sonifiziert. Die Beschallung diente dazu, auch luminale Proteine der Salzeinwirkung auszusetzen. Anschließend wurden die Membranvesikel durch Ultrazentrifugation für 2 h bei 100.000 x g bei 4 °C (SW40Ti-Rotor) pelletiert und in 750 µl 10 mM HEPES/KOH pH 8.0, 10 mM MgCl₂, 330 mM Sorbit, 2 mM PMSF, 2 mM BAM resuspendiert. Die abgelösten Proteine im Überstand wurden mit 15 % (w/v) Trichloressigsäure 30 Min. bei 4 °C gefällt, für 30 min bei 10.000 Upm bei 4 °C zentrifugiert und die TCA-Pellets mit 80 % (v/v) Azeton gewaschen. Zuletzt wurden diese Pellets in je 750 µl des obigen Puffers resuspendiert.

II.6.6 Thermolysin-Behandlung intakter und sonifizierter Spinat-Thylakoide

Angelehnt an die Methode von Cline *et al.* (1984) wurden intakte Spinat-Thylakoide in einer Konzentration entsprechend 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. Nach 1, 2, 5, 10, 15, und 20 min wurde ein Aliquot von 500 µl entnommen und die Proteolyse durch Zugabe von EDTA ad 50 mM Endkonzentration und Eiskühlung gestoppt. Anschließend wurden die Thylakoide für 10 min bei 10.000 Upm bei 4 °C zentrifugiert und in 100 µl 10 mM HEPES/KOH pH 8.0 resuspendiert. Zur Herstellung einer Mischung aus inside-out und right-side-out Vesikeln wurden Spinat-Thylakoide in obiger Konzentration in 10 mM HEPES/KOH, pH 7.8, 10 mM MgCl₂, 330 mM Sorbit dreimal für je 15 sec mit dem Branson Sonifier B12 auf Stufe 5 unter Eiskühlung beschallt. 6 ml davon wurden wie die intakten Thylakoide obiger Behandlung unterzogen, allerdings erfolgte die Zentrifugation für 30 min bei 14.000 Upm. Die 0-Kontrollen für intakte und beschallte Thylakoide wurden jeweils der entsprechenden Prozedur unterzogen, jedoch ohne Thermolysin-Zugabe.

Proben aus den in den Abschnitten II.6.2-6 beschriebenen Isolationen, Fraktionierungen und Inkubationen wurden freundlicherweise von Henning Plücken (Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf) zur Verfügung gestellt.

II.6.7 Konzentrationsbestimmung von Proteinen und Chlorophyll

Proteinkonzentrationen wurden nach der Methode von Bradford (1976) bestimmt. Membranproteine wurden zuvor mit 10 % (w/v) Octyl-β-D-glucopyranosid solubilisiert. Entsprechende Eichkurven wurden mit BSA-Konzentrationsreihen erstellt. Chlorophyll-Konzentrationsbestimmungen wurden nach der Methode von Arnon (1949) durchgeführt.

II.6.8 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Zur gelelektrophoretischen Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe wurden diskontinuierliche Polyacrylamidgele (Dicke: 1mm, Trenngelstrecke 17 cm) nach Laemmli (1970) verwendet. Dabei enthielt das Trenngel 12.5 % (w/v) Polyacrylamid (Acrylamid/N,N-Methylbisacrylamid: 30/0.8), 375 mM Tris/HCl pH8.8, 0.1 % (w/v) SDS und im Falle der Auftrennung von Membranproteinen 6 M Harnstoff. Das Sammelgel enthielt 5 % (w/v) Polyacrylamid, 125 mM Tris/HCl pH 6.8 und gegebenenfalls 6 M Harnstoff. Der Laufpuffer setzte sich zusammen aus 25 mM Tris/HCl pH 8.8, 192 mM Glycin und 0.1 % (w/v) SDS. Die Proteinproben wurden zur Vorbereitung auf die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese solubilisiert. Dazu wurden sie 15 min bei Raumtemperatur und 30 sec bei 70 °C in 2 % (w/v) SDS, 10 % (v/v) 2-Mercaptoethanol, 62.5 mM Tris/HCl pH6.8 und 10 % (w/v) Glycerin (Laemmli, 1970) inkubiert. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Spannung von 100-140 V für 12-18 Stunden. Bei Bedarf wurden die Gele mit 0.25 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau, 50 % (v/v) Methanol, 7 % (v/v) Essigsäure angefärbt.

II.6.9 Immunotransfer-Analysen aufgetrennter Proteine

Zur immunologischen Analyse wurden die Proteine nach ihrer gelelektrophoretischen Auftrennung mittels einer Trockenblot-Apparatur (CTI, Taunusstein) auf PVDF-Membranen (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) oder Nitrocellulose-Membranen (0.1 µm, BA79, Schleicher und Schuell, Dassel) transferiert (Towbin, 1979). Der Transferpuffer enthielt 96 mM Glycin, 10 mM Tris und 10 % (v/v) Methanol. Der Transfer erfolgte für zwei Stunden bei einer konstanten Stromstärke von 0.4 mA/cm² Filterfläche. Danach wurden die Filter zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen eine Stunde in Rotiblock-Reagenz (Roth, Karlsruhe) abgesättigt und 15 min in TBS-T (20 mM Tris/HCl pH7.6, 137 mM NaCl, 0.1 % (v/v) Triton X-100) gewaschen. Die Erstantikörper-Inkubation (Verdünnung 1:1000 – 1:5000) erfolgte über Nacht bei 4 °C in TBS-T, gefolgt von dreimaligem Waschen in TBS-T (1x15 min, 2x5 min). Daraufhin wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur mit Zweitantikörper (Antikörper-Peroxidase-Konjugat, Verdünnung 1:20000) inkubiert und wiederum wie oben gewaschen. Die Detektion der gebundenen Antikörper erfolgte mit dem Enhanced Chemiluminescence System nach den Angaben des Herstellers (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden).

II.6.10 *In vivo*-Markierung von Blattproteinen und Immunopräzipitation

Ca. 30 Primärblätter von 12-15 Tage alten Pflanzen wurden in Wasser mit 200 µg/ml Cycloheximid zur Hemmung der cytoplasmatischen Translation 30 min bei RT vorinkubiert. Anschließend wurden die Blättchen mit dem Hypokotyl in Mikrotiterplatten in Wasser mit 5 µCi [³⁵S]-Methionin (spezifische Aktivität > 1000 Ci/mmol) und 100 µg/ml Cycloheximid getaucht und 30 min bei 25 °C markiert. Nach fünfmaligem Waschen mit Homogenisationspuffer (50mM Tris HCl pH 7.5, 150mM NaCl, 2mM EDTA) wurden die Blätter mit einem motorgetriebenen Pistill in 300 µl desselben Puffers zermörsert. Die Membranen wurden 10 min bei 12.000 Upm bei 4°C abzentrifugiert, einmal gewaschen und in 100 µl Homogenisationspuffer resuspendiert. Die Proben wurden dann auf eine Endkonzentration von 2 % (w/v) SDS eingestellt und zuerst 10 min bei RT, danach 30 sec bei 70 °C solubilisiert. Nichtsolubilisiertes Material wurde 5 min bei 14.000 Upm bei RT pelletiert. Für die Immunopräzipitation wurden Aliquots entsprechend 200.000 c.p.m. eingebauter Radioaktivität zehnfach mit IP-Puffer (50mM Tris HCl pH 7.5, 150mM NaCl, 2mM EDTA, 1 % (v/v) Nonident P40) verdünnt, 20µl Bettvolumen Protein A-Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) zugegeben und 1h bei RT auf dem Überkopfschüttler inkubiert, um unspezifisch bindende Proteine zu entfernen. Anschließend wurde 5 min bei 12.000 Upm bei RT zentrifugiert, der Überstand mit 5µl Immunsersum versetzt und über Nacht bei 4°C auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Antikörper-Antigen-Komplexe wurden durch Inkubation mit 30µl Bettvolumen Protein A-Sepharose für 1h bei RT auf dem Überkopfschüttler an die Sepharose gebunden. Nach Zentrifugation für 5 min bei 3000 Upm bei RT wurde das Protein A-Sepharose-Pellet 2x mit 1ml IP-Puffer und 2x mit 1ml Homogenisationspuffer gewaschen. Die Dissoziation der Antikörper-Antigen-ProteinA-Komplexe erfolgte durch Inkubation mit Gel-Ladepuffer (2 % (w/v) SDS, 10 % (v/v) 2-Mercaptoethanol, 62.5 mM Tris/HCl pH 6.8 und 10 % (w/v) Glycerin (Laemmli, 1970) für 30 sec bei 70 °C. Die Proteine wurden auf einem 12.5 % igen SDS-Polyacrylamidgel nach Laemmli (1970) aufgetrennt. Die Gele wurden im Vakuum-Geltrockner (Biorad, München) bei 80 °C für 2h getrocknet. Die radioaktiv-markierten Proteine wurden durch Autoradiografie detektiert und im Biolumager (Biolumaging Analyser BAS-1800, Fuji Photo Film Co, Düsseldorf) mit den Programmen Image Reader BAS 1.4 und Image Gauge 3.0 quantifiziert.

II.6.11 Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine zur Antikörpergewinnung

Die Proteinexpression erfolgte als Glutathion-S-Transferase-Fusionsprotein in *E.coli*, wobei der Glutathion-S-Transferase-Anteil N-terminal vorlag. Die das zu exprimierende Protein kodierende Nukleotidsequenz wurde im Leseraster mit der Sequenz der Glutathion-S-Transferase (GST) des Expressionsvektors pGEX4T3 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) fusioniert und das Konstrukt in den *E.coli* Stamm BL21(DE3)pLysE (Novagene, Madison, USA) transformiert. Die Zellen wurden über Nacht bei 37° C bei 200 Upm in LB-Medium (10 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Hefe-Extrakt, 10 g/l NaCl, pH 7.2) mit 100 mg/l Ampicillin angezogen, dann 1:10 verdünnt und 3 Stunden weiterinkubiert. Anschließend wurde für 4 Stunden mit 1 mM Isopropylthio- β -D-galactosid die Expression des Fusionsproteins induziert. Dann wurden die Zellen abzentrifugiert, in 50 mM Tris/HCl pH 7.9, 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 0.01 % (w/v) Triton X-100 resuspendiert, daraufhin mit Lysozym in einer Endkonzentration von 1 mg/ml versetzt und für mindestens 2 Stunden bei -20° C eingefroren. Nach Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur wurde das Lysat mit dem Branson Sonifier B12 (Danbury, USA) fünfmal bei Stufe 7-9 für jeweils 30 sec sonifiziert. Da die exprimierten Proteine in Einschlußkörperchen vorlagen, wurde die beschallte Zellsuspension abzentrifugiert (10.000 Upm, 4° C, 20 min) und das Pellet in 2 % (w/v) SDS, 10 % (v/v) 2-Mercaptoethanol, 62.5 mM Tris/HCl pH 6.8 und 10 % (w/v) Glycerin (Laemmli, 1970) solubilisiert. Dieser Proteinrohextrakt wurde über präparative SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (Hager und Burgess, 1980) aufgetrennt wie unter II.6.8 beschrieben, wobei 4 mm dicke Gele verwendet wurden. Das Fusionsprotein wurde herausgeschnitten, das Gelstück in einem Waring-Blendor zerkleinert und in 1 Volumen Elutionspuffer (50 mM Tris/HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 0.75 % (w/v) N-Laurylsarkosinat, 0.5 % (v/v) 2-Mercaptoethanol) über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Durch Filtration über silikonisierte Glaswolle wurde der Überstand vom Polyacrylamid getrennt. Durch Zugabe von Triton X-100 ad 1.5 % (w/v) Endkonzentration wurden Mischmizellen mit dem N-Laurylsarkosinat des Elutionspuffers gebildet, so daß die denaturierende Wirkung der Detergenzien weitgehend aufgehoben wurde. Pro 10 mg Fusionsprotein wurden 50 U Thrombin zugesetzt und bei Raumtemperatur für mindestens 6 h bei gelegentlicher Durchmischung inkubiert, wobei das Fremdprotein vom GST-Teil getrennt wurde. Das geschnittene Protein konnte dann in einer zweiten präparativen SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt und der Fremdproteinanteil wie oben beschrieben ausgeschnitten und eluiert werden, wobei der Elutionspuffer als Detergenz 0.5 % (w/v) SDS enthielt.

1-2 mg aufgereinigtes Protein wurden für die Immunisierung von Kaninchen zur Gewinnung des Antiserums eingesetzt, weitere 4 mg für die Affinitätsaufreinigung des Serums. Diese Arbeiten wurden von der Firma BioGenes (Berlin) durchgeführt.

II.6.12 Expression rekombinanter Proteine in *E.coli* und Aufreinigung aus dem Periplasma

Für die Proteinexpression wurde das zu exprimierende Protein N-terminal mit einem Histidin-Tag versehen, was die Aufreinigung über Metall-Chelat-Chromatografie erlaubte. N-terminal vor dem Histidin-Tag befand sich außerdem eine Transitsequenz, die dafür sorgte, daß das Protein ins Periplasma exportiert wurde, wo die Transitsequenz von der bakteriellen Transport-Maschinerie abgespalten wurde.

Die das zu exprimierende Protein kodierende Nukleotidsequenz wurde im Leseraster mit der Sequenz des Histidin-Tags in den Expressionsvektor pAH33 (Seidler, 1994) kloniert und das resultierende Plasmid in den *E.coli*-Stamm SF110 (Meerman und Georgiou, 1994) transformiert. Dieser Stamm zeichnet sich dadurch aus, daß die periplasmatischen Proteasen ausgeschaltet wurden. Die Zellen wurden in TP-Medium (2 % (w/v) Trypton, 1.5 % (w/v) Hefeextract, 0.8 % (w/v) NaCl, 0.2 % (w/v) Na₂HPO₄, 0.1 % (w/v) KH₂PO₄) (Moore *et al.*, 1993) bei 25 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0.6 angezogen und die Proteinexpression für 12-14 h bei 25 °C durch Zusatz von Isopropylthio-β-D-galactosid ad 0.5 mM Endkonzentration induziert. Dann wurden die periplasmatischen Proteine nach der Methode von Seidler (1994) isoliert, wobei die Lysozym-Inkubation weggelassen wurde. Die Proteinfraction wurde anschließend gegen Puffer A (20 mM HEPES pH 7.5, 500 mM NaCl) dialysiert und auf eine mit Zn²⁺ geladene Metall-Chelat-Chromatografie-Säule (Chelating Sepharose FF, 1.5 x 12 cm, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) gegeben. Die Säule wurde mit 30 ml Puffer A mit 20 mM Imidazol gewaschen und anschließend erfolgte die Elution des Fusionsproteins mittels eines linearen Gradienten von 20-350 mM Imidazol in 150 ml Puffer A.

Diese Arbeiten wurden zur Gewinnung von rekombinantem HCF164 für enzymatische Messungen freundlicherweise von Dr. Andreas Seidler (Ruhr-Universität, Bochum) durchgeführt.

II.6.13 Insulin-Disulfid-Reduktions-Test zum Nachweis von Thioredoxin-Aktivität

Der Insulin-Disulfid-Reduktions-Test wurde nach der Methode von Holmgren (1979) durchgeführt. Er dient dem Nachweis der Thiol-Disulfid-Reduktase-Aktivität von Thioredoxinen und Thioredoxin-ähnlichen Proteinen. Das Testprinzip beruht darauf, daß Insulin aus einer A- und einer B-Kette besteht, die über zwei intermolekulare Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. In Anwesenheit von DTT katalysieren Thioredoxine die Spaltung dieser Disulfide, was zur Präzipitation der nun unlöslichen B-Kette führt. Die dabei entstehende Trübung des Reaktionsansatzes kann anhand der Absorptionsänderung bei 650 nm gemessen werden. Der Reaktionsansatz mit einem Endvolumen von 1 ml enthielt 100 mM Natriumphosphat pH 7.0, 1 mM EDTA, 1 mg/ml Insulin (Rinderinsulin, Sigma, München) und 2 µM bzw. 5 µM rekombinantes Test-Protein. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0.35 mM DTT gestartet und bei Raumtemperatur durchgeführt. Die nicht-enzymatische Reduktion von Insulin durch DTT wurde als Negativkontrolle ebenfalls gemessen.

Die Messungen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Andreas Seidler (Ruhr-Universität, Bochum) durchgeführt.

II.7 Suche nach Interaktionspartnern mittels Sichtung einer *Arabidopsis*-cDNA-Bank im Hefe-Zweihybridsystem

Prinzip des Hefe-Zweihybridsystems:

Das Hefe-Zweihybridsystem dient der Identifizierung von Proteinen, die mit einem bekannten Faktor interagieren. Dabei macht man sich zunutze, daß viele eukaryotische Transkriptionsfaktoren aus zwei funktionell unabhängigen und physikalisch trennbaren Domänen bestehen. Sie enthalten eine DNA-Bindedomäne, die an eine spezifische UAS-Sequenz (upstream activating sequence) bindet und eine Aktivierungsdomäne, die den RNA Polymerase II-Komplex zur Transkription des dahinterliegenden Gens aktiviert. Beide Domänen sind für die Transkriptionsaktivierung notwendig und in der Regel Teile desselben Proteins. Werden sie voneinander getrennt und in Hefe koexprimiert, findet keine Interaktion zwischen beiden Domänen statt und somit erfolgt auch keine Transkriptionsaktivierung des zugehörigen Gens. Fusioniert man nun die DNA-Bindedomäne mit einem Protein X und die Aktivierungsdomäne mit einem Protein Y und koexprimiert diese Hybridproteine in Hefe, so werden bei einer Interaktion von X und Y die beiden Domänen wieder in räumliche Nähe gebracht und es findet Transkriptionsaktivierung des zugehörigen Gens statt.

Zur Interaktionspartnersuche wurde eine Kombination der Systeme Matchmaker Two Hybrid-System I und II der Firma Clontech (Palo Alto, USA) verwendet, wobei der Transkriptionsaktivator Gal4 der Hefe eingesetzt wurde. Im Hefetransformationsvektor pGBT9 lag die Sequenz der DNA-Bindedomäne vor, hinter welche im Leserahmen die Sequenz des Köderproteins fusioniert wurde. Außerdem war der Selektionsmarker TRP1 enthalten. Dieses Konstrukt wurde mittels Hefetransformation nach der Lithiumacetat/PEG-Methode nach Angaben des Herstellers in den Hefestamm PJ69-4A (James *et al.*, 1996) transformiert. Dieser Stamm besitzt Deletionen in den Aminosäuresynthese-Genen HIS3, LEU2, TRP1 und ADE2. Des weiteren sind die Gene GAL4 und GAL80 deletiert. Ein GAL1-UAS-GAL1-TATA-Konstrukt wurde vor einem HIS3-Reportergen im Kerngenom verankert. Ferner wurde ein GAL2-UAS-GAL2-TATA-Konstrukt vor ein ADE2-Reportergen ins Kerngenom inseriert. Beide UAS Sequenzen werden vom Transkriptionsaktivator Gal4 erkannt. Der Stamm trägt den Paarungstyp Mat a.

Die zu sichtende *Arabidopsis*-cDNA-Bank (siehe II.1.6) lag im Vektor pGAD10 vor. Dieser enthielt den Selektionsmarker LEU2 sowie die Sequenz der Aktivator-domäne, hinter die im Leserahmen die Sequenz der Beuteproteine ligiert war. Die Bank wurde zunächst in *E. coli* DH5 α amplifiziert (Wachstum über Nacht bei 28° C in 500 ml LB-Medium (10 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Hefe-Extrakt, 10 g/l NaCl, pH 7.2) mit 50 mg/l Ampicillin), die Plasmid-DNA über Säulenaufreinigung (Plasmid MegaPrep, Qiagen, Hilden) isoliert und 200 μ g DNA wurden in transformationskompetente Zellen des Hefestammes Y187 transformiert. Die Transformationsprozedur sowie die Herstellung von Stammkulturen erfolgte nach Vorgaben des Herstellers. Der Hefestamm Y187 (Harper *et al.*, 1993) besitzt den Paarungstyp Mat α und es sind die Gene HIS3, LEU2, TRP1, ADE2, GAL4 und GAL80 ausgeschaltet.

Die beiden Hefestämme PJ69-4A und Y187 können miteinander gekreuzt werden, wobei diploide Zellen entstehen, die sowohl Köder- als auch Beuteplasmid tragen und deshalb auf SD-Medium (6.7 g/l Bacto-Hefe-Stickstoff Basis ohne Aminosäuren, 20 g/l Glucose, 50 ml/l Sörensen-Puffer, Zusatz entsprechender DO-Aminosäure-Supplements (Clontech, Palo Alto, USA) nach Herstellerangaben) ohne Tryptophan und ohne Leucin wachsen können. Mit ihnen kann ein Test auf Aktivierung der Reportergene HIS3 und ADE2 durchgeführt werden, um zu untersuchen, ob Köder und Beute miteinander interagieren.

Die beiden transformierten Hefestämme wurden durch Kreuzung nach Vorgaben des Herstellers vereinigt. Die Selektion auf diploide Zellen mit Interaktion erfolgte über 3 Wochen Inkubation bei 30°C auf SD-Platten ohne Leucin, ohne Tryptophan und ohne Histidin mit Zusatz von 5 mM 3-Amino-1.2.4-triazol 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 Hefe 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.

II.8 Spektroskopische Methoden

II.8.1 Chlorophyll-Fluoreszenz-Induktionsanalysen an intakten *Arabidopsis*-Pflanzen

Die Chlorophyll a-Fluoreszenz von zwei Wochen alten Pflanzen wurde bei Raumtemperatur mittels eines Puls-Amplituden-Modulations-Fluorometers (PAM 101/103; FL101, 101 ED, 101F, Walz, Effeltrich) angeregt und gemessen (Schreiber *et al.*, 1986; Schreiber, 1986). Die Auswertung der Fluoreszenzmessungen erfolgte nach der Nomenklatur von van Kooten und Snel (1990). Die Pflanzen wurden vor der Messung unter der Faseroptik für mindestens fünf Minuten vorverdunkelt. Die Grundfluoreszenz F_0 wurde durch gepulstes Meßlicht angeregt (Taktfrequenz 1.6 kHz, Pulsdauer 1 μ sec, Peakwellenlänge 650 nm, Photonenflussdichte PFD 1 μ mol/m²/s). Ein sättigender Weißlichtpuls (PFD 6000 μ mol/m²/s, Pulsdauer 200 ms) diente zur Ermittlung der maximalen Fluoreszenz F_m . Somit ließ sich auch die variable Fluoreszenz $F_v = F_m - F_0$ sowie das Verhältnis F_v / F_m berechnen. Die Anregung der Photosynthese erfolgte durch aktinisches Licht (PFD 130 μ mol/m²/s), dabei wurde für 5 min die Einstellung des photosynthetischen Fließgleichgewichts F_s verfolgt. Sättigende Weißlichtpulse während dieser Belichtungsphase dienten zur Bestimmung der photochemischen Fluoreszenzlöschung [$qP = (F_m' - F_s)/(F_m' - F_0')$], der nicht-photochemischen Fluoreszenzlöschung [$qN = 1 - (F_m' - F_0')/(F_m - F_0)$] und der Quantenausbeute des Photosystems II [$\Phi_{II} = (F_m' - F_s)/F_m'$] (Schreiber, 1986; Genty *et al.*, 1989).

II.8.2 P700-Redox-Kinetiken an intakten *Arabidopsis*-Blättern

Der Redoxzustand des P700 wurde mit einem modifizierten PAM-Fluorometer (PAM101, Walz, Effeltrich), das mit der Emittor-Detektor-Einheit P700 DW-T (Walz, Effeltrich) ausgestattet war, gemessen (Schreiber *et al.*, 1988). Ermittelt wurde die differentielle Absorptionsänderung (Wellenlänge 810 nm minus 860 nm). Die vorverdunkelten Blätter wurden 5 min mit aktinischem Licht bestrahlt (PFD 130 μ mol/m²/s). Bei Meßlicht (Taktfrequenz 100 kHz) mit der maximalen abgleichbaren Lichtintensität wurde die Absorptionsänderung ΔA sofort nach Ausschalten des aktinischen Lichts gemessen. Durch Einstrahlung von Fernrotlicht (Wellenlänge 720 nm, PFD 15 μ mol/m²/s, Fotodiode 102 FR, Walz, Effeltrich) wurde die maximale Absorptionsänderung ΔA_{max} bestimmt. Dabei wurde die kurzzeitige Reduktion des P700 durch einen sättigenden Weißlichtpuls (200 ms, PFD 6000 μ mol/m²/s) bewirkt. Schließlich konnte die Quantenausbeute des Photosystems I [$\Phi_I = (1 - \Delta A/\Delta A_{max})$] ermittelt werden (Harbinson und Woodward, 1987).

II.9 Komplementation von *hcf*-Mutanten von *Arabidopsis thaliana* über Agrobakterien-vermittelte Wurzeltransformation

Eine cDNA-Nukleotidsequenz, die das von der Mutation betroffene Gen repräsentierte, wurde in die *Bam*HI-Restriktionsschnittstelle des Pflanzentransformationsvektors pPCV91 (Strizhov *et al.*, 1996) inseriert, so daß sie bei der späteren Expression in den Pflanzenzellen unter der Kontrolle des 35S-Promotors des Cauliflower Mosaik Virus stand. Das Plasmid wurde mittels Elektroporation in elektrokompente Zellen des *E.coli*-Stammes S17-1 (Simon, 1984) transformiert. Anschließend wurde das Konstrukt aus dem S17-1-Donorstamm über Konjugation in den *Agrobacterium tumefaciens*-Stamm GV3101 (pPM90RK) (Koncz *et al.*, 1994) transformiert. Dazu wurden die transformierten S17-1-Zellen über Nacht bei 37 °C in LB-Medium (10 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Hefe-Extrakt, 10 g/l NaCl, pH 7.2) mit 50 µg/ml Ampicillin angezogen. Parallel wurden die Agrobakterien für ca. 36 h bei 28 °C in YEB-Medium (5 g/l Fleischextrakt, 1 g/l Hefe-Extrakt, 5 g/l Bacto-Peptone, 5 g/l Saccharose, 2 ml/l 1 M MgCl₂) unter Zusatz von 100 µg/ml Rifampicin und 25 µg/ml Kanamycin angezogen. Dann wurden beide Stämme in YEB-Medium zweifach verdünnt und 15 min bei 28 °C weiterinkubiert. Für die Konjugation wurden 0.5 ml beider Kulturen vermischt, in 100 µl-Portionen auf YEB-Platten getropft und diese für 1 h unter der Sterilbank getrocknet. Nach Inkubation für 24 h bei 28 °C wurden kleine Portionen der entstandenen Konjugationsinseln in 1 ml YEB-Medium resuspendiert, je 50 µl einer daraus gewonnenen 1:10, 1:100 sowie 1:1000 Verdünnung auf YEB-Platten mit 100 µg/ml Rifampicin, 25 µg/ml Kanamycin und 100 µg/ml Carbenicillin ausplattiert und transkonjugate Agrobakterien bei 28 °C in 72 h angezogen. Zur Kontrolle der Plasmide wurde eine Rückkonjugation nach *E.coli* DH5α analog zur Hinkonjugation durchgeführt, die Plasmide dann daraus isoliert und anschließend über Restriktionsverdaus kontrolliert. Die auf diese Weise indirekt kontrollierten transkonjugaten Agrobakterien wurden für die Wurzeltransformation in 250 ml YEB-Medium mit 100 µg/ml Rifampicin, 25 µg/ml Kanamycin und 80 µg/ml Carbenicillin für ca. 48 h bei 28 °C angezogen, abzentrifugiert und in 40 ml MSAR I resuspendiert. Die Wurzeln von 20 zwei Wochen alten homozygoten Mutanten wurden in der Bakteriensuspension in 1 cm große Stücke geschnitten und 1 h darin inkubiert. Die Wurzelstücke wurden daraufhin mit MSAR I gespült und bei Raumtemperatur bei 50 Upm unter Langtagbedingungen in 50 ml MSAR I geschüttelt. Nach 48 h wurde das Medium durch MSAR I mit 500 mg/l Betabactyl (Tricarillin/Clavulansäure, 15:1, Smith Kline Beecham, München) und 300 mg/l Claforan (Hoechst, Frankfurt) zum Abtöten der Agrobakterien ersetzt. Dieser Medienwechsel wurde alle 4 Tage wiederholt. Nach zwei Wochen wurden die Wurzelstücke zur Kallusbildung auf MSAR II-Platten mit 15 mg/l Hygromycin zur Selektion von transformierten Kalli übertragen. Alle zwei Wochen wurden die Wurzelstücke auf frisches Medium überführt, wobei entstehende Sprosse vom restlichen Wurzelgewebe abgetrennt wurden. Nach 4-6 Wochen wurden die Sprosse auf SG-Medium übertragen und nach einer weiteren Woche zur

Induktion der Wurzelbildung auf SG-Medium mit 2 mg/l Indolylessigsäure umgesetzt. Schließlich wurden die entstandenen Pflanzen zur Blütenbildung und Samenproduktion auf Komposterde in Arasystem-Platten (BetaTech, Gent, Belgien) umgepflanzt und wie unter II.2 beschrieben angezogen. Zur Anpassung an die geringere Luftfeuchtigkeit wurden sie zunächst für eine Woche mit Haushaltsfolie abgedeckt, wobei der Abstand der Folie sukzessive vergrößert wurde.

MSAR-Stammlösungen:

Makro-Elemente:	20.0 g/l NH_4NO_3 , 40.0 g/l KNO_3 , 7.4 g/l $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 3.4 g/l KH_2PO_4 , 2.0 g/l $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \times \text{H}_2\text{O}$
Mikro-Elemente:	6.3 g/l H_3BO_3 , 16.9 g/l $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, 8.6 g/l $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0.25 g/l $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0.025 g/l $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$, 0.025 g/l $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$
Fe-EDTA:	8.06 g/l Fe-EDTA
CaCl_2 :	7.5 g/l $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$
KI:	0.375 g/l KI
Vitamine:	50.0 g/l myo-Inositol, 2.5 g/l Thiamin x HCl, 0.5 g/l Nikotinsäure, 0,2 g/l Pyridoxin x HCl

MSAR-Medien:

Für 1 Liter MSAR-Medium wurden folgende Mengen an Stammlösungen zusammengegeben:

50 ml Makro-Elemente, 1 ml Mikro-Elemente, 5 ml Fe-EDTA, 5.8 ml CaCl_2 , 2.2 ml KI, 2 ml Vitamine und 30 g Saccharose. Der pH-Wert wurde mit 0.5 M KOH-Lösung auf 5.8 eingestellt und für festes Medium wurden 3 g Gelrite (Roth KG, Karlsruhe) hinzugefügt. Das Medium wurde für 20 min autoklaviert und anschließend mit verschiedenen Hormonzusätzen versehen.

MSAR I:	MSAR mit 2.0 mg/l Indolylessigsäure (IAA), 0.5 mg/l 2,4 Dichlorphenoxy-Essigsäure (2,4-D), 0.2 mg/l Kinetin, 0.2 mg/l N_6 -(2-isopentenyl)-Adenosin (IPA)
MSAR II:	MSAR mit 2.0 mg/l N_6 -(2-isopentenyl)-Adenosin (IPA), 0.05 mg/l α -Naphthalen-Essigsäure (NAA)
SG-Medium:	MSAR mit halber Konzentration an Makro-Elementen und 0,5 % (w/v) Saccharose

III. Ergebnisse

III.1 Charakterisierung der Mutanten *hcf153* und *hcf164*

Die Mutanten *hcf153* und *hcf164* stammten aus einer T-DNA-Mutanten-Kollektion des Institute National de la Recherche Agronomique (Versailles, Frankreich). Sie wurden mittels *in-planta*-Insertionsmutagenese über Vakuuminfiltration gewonnen (Bechtold *et al.*, 1993), wobei der Pflanzen-Transformationsvektor pGKB5 verwendet wurde. Seine T-DNA enthält zwei Selektionsmarker, die Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Kanamycin und dem Herbizid Basta verleihen. An der rechten Grenze der T-DNA befindet sich außerdem ein promotorloses β -Glucuronidase-Reportergen (Bouchez *et al.*, 1993).

Die Mutanten zeigten den für Photosynthesemutanten typischen hcf-Phänotyp und waren unter UV-Licht am roten Aufleuchten der Blätter vom Wildtyp zu unterscheiden. Bei Anzucht auf Erde verkümmerten sie sehr bald nach der Keimung. Auf zuckerhaltigem Medium konnten sie jedoch erhalten werden, konnten aber nicht zur Blütenbildung gebracht werden. Bei Anzucht auf zuckerhaltigem Medium unterscheidet sich die Mutante *hcf153* rein äußerlich nicht vom Wildtyp, während die Mutante *hcf164* bleicher und kleiner ist als der Wildtyp.

Zur Charakterisierung der Mutanten wurde ihr jeweiliger Defekt zunächst über spektroskopische Messungen der Chlorophyll-Fluoreszenz-Induktion und der Redox-Kinetik des P700 eingegrenzt, was durch immunologische Analysen konkretisiert wurde. Anschließend wurde über Northern-Analysen und Proteinmarkierungsexperimente ermittelt, auf welcher Ebene der Genexpression der Wirkort der Mutationen anzusiedeln ist.

III.1.1 In den Mutanten *hcf153* und *hcf164* ist der intersystemische Elektronentransport gestört

Der hcf-Phänotyp zeigte an, daß in den Mutanten *hcf153* und *hcf164* der photosynthetische Elektronentransport gestört ist. Zur näheren Eingrenzung des Defekts wurde die Chlorophyll-Fluoreszenz-Induktion im Vergleich zum Wildtyp gemessen (Abb. 2). Dabei zeigte sich, daß das Verhältnis von variabler Fluoreszenz F_v zur maximalen Fluoreszenz F_m bei den Mutanten *hcf153* mit einem Wert von 0.80 und *hcf164* mit einem Wert von 0.76 vergleichbar zum Wildtyp mit einem Wert von 0.79 ist (Tab. 4), was darauf hindeutete, daß das PS II funktionsfähig ist. Demgegenüber zeigte sich, daß die photochemische Löschung bei *hcf153* mit 0.11 und bei *hcf164* mit 0.03 gegenüber dem Wildtyp mit einem Wert von 0.23 drastisch reduziert ist. Dies ist damit zu erklären, daß sich die vom PS II entlassenen Elektronen im Plastochinon-Pool anhäufen und nicht entlang der photosynthetischen Elektronentransportkette weitergeleitet werden.

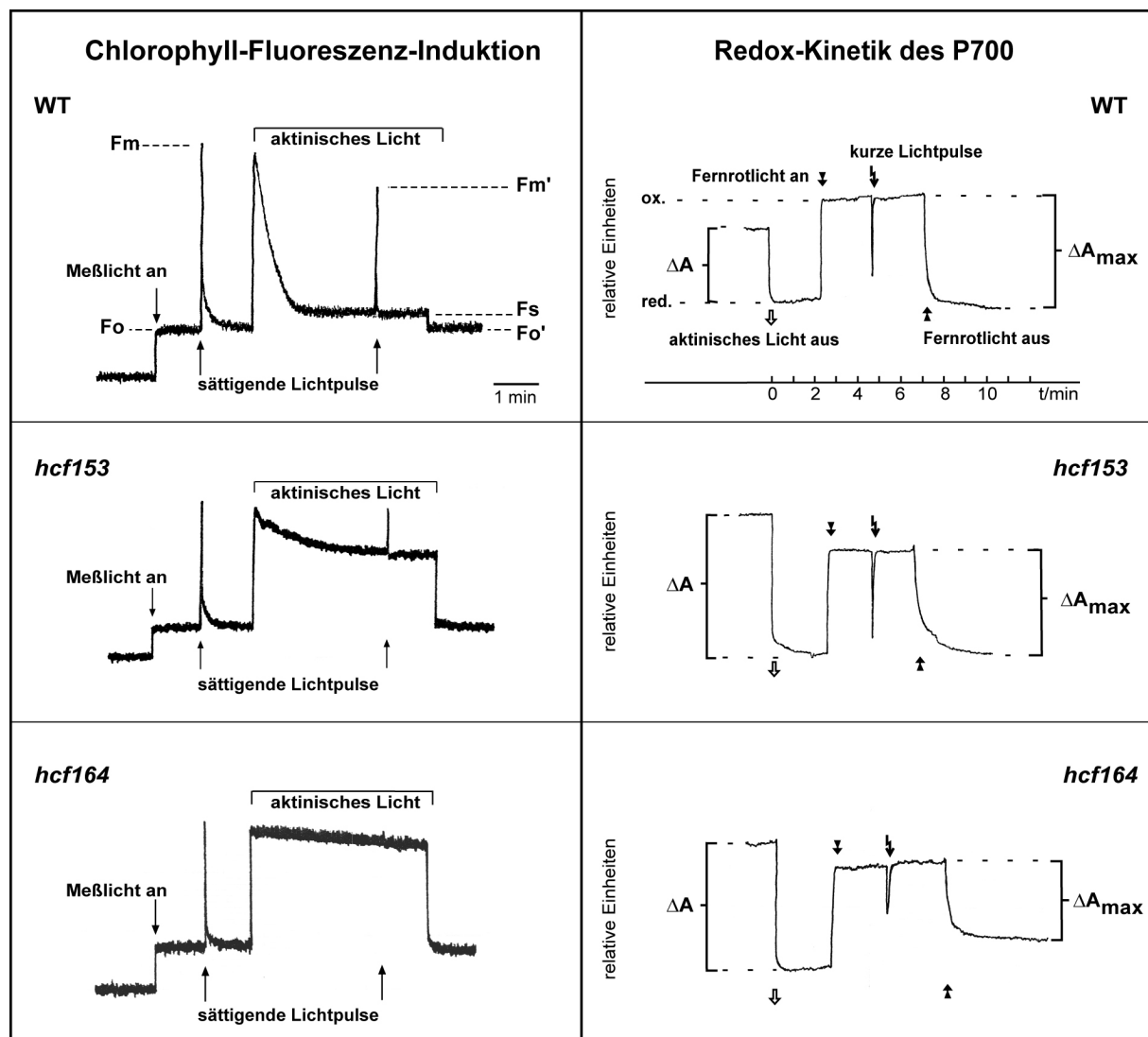


Abb. 2: Spektroskopische Messungen an den Mutanten *hcf153* und *hcf164* im Vergleich zum Wildtyp. Dargestellt ist jeweils eine repräsentative Messung von fünf Messungen der Chlorophyll-Fluoreszenz-Induktion sowie von drei Messungen der P700-Redox-Kinetik an unabhängigen Pflanzen. Die Messungen wurden wie unter Material und Methoden beschrieben durchgeführt.

Der Elektronenrückstau kann einerseits durch eine Störung im intersystemischen Elektronentransport aber auch durch einen Defekt im PS I hervorgerufen werden. Um zwischen diesen beiden Möglichkeiten zu unterscheiden, wurde die Funktion des PS I mittels Messung der Absorptionskinetik des P700 untersucht (Abb. 2). Dunkelrotlicht führte dabei in beiden Mutanten zu einer deutlichen Absorptionsänderung, die mit der im Wildtyp vergleichbar war. Dieses Ergebnis zeigt an, daß das PS I funktionsfähig ist. Gibt man im Dunkelrotlicht-Hintergrund einen kurzen sättigenden Lichtpuls, so führt das sowohl in den Mutanten als auch im Wildtyp zur kurzzeitigen Re-Reduktion des PS I, was zeigt, daß das PS I durch die vom PS II entlassenen Elektronen reduziert werden kann. Diese Re-Reduktion ist jedoch in der Mutante *hcf164* vermindert.

Die spektroskopischen Messungen zeigen, daß bei beiden Mutanten sowohl das PS I als auch das PS II funktionsfähig ist und der Defekt deshalb im intersystemischen Elektronentransport anzusiedeln ist. Außerdem ist ersichtlich, daß die Mutante *hcf164* stärker betroffen ist, da sowohl die Fluoreszenzlöschung während der Chlorophyll-Fluoreszenz-Induktion als auch die Re-Reduktion durch den sättigenden Lichtpuls während der P700-Redox-Kinetik in dieser Mutante drastischer reduziert ist als in der Mutante *hcf153*.

	Fv/Fm	Φ_{II}	qP	qN	Φ_I
Wildtyp	0.79	0.68	0.88	0.23	0.34
<i>hcf153</i>	0.80	0.31	0.39	0.11	-0.32
<i>hcf164</i>	0.76	0.11	0.16	0.03	-0.63

Tabelle 4: Spektroskopische Parameter der Messungen von Chlorophyll-Fluoreszenz-Induktion und P700-Redox-Kinetik der Mutanten *hcf153* und *hcf164* sowie des Wildtyps. Angegeben sind die Mittelwerte aus fünf bzw. bei Φ_I aus drei unabhängigen Messungen. Für die Beschreibung der Parameter siehe Material und Methoden.

III.1.2 Die Untereinheiten des Cytochrom b_6f -Komplexes liegen in den Mutanten in reduzierten Mengen vor

Aus den spektroskopischen Messungen konnte abgeleitet werden, daß bei beiden Mutanten der intersystemische Elektronentransport gestört ist. Um dies genauer aufzuschlüsseln, wurden die Proteinspiegel der photosynthetischen Komplexe mittels Immunoblot-Analysen untersucht. Dabei wurden Antiseren gegen repräsentative Untereinheiten der Photosysteme I und II und gegen die vier großen Untereinheiten des Cytochrom b_6f -Komplexes eingesetzt und die Proteinspiegel der Mutanten mit einer Konzentrationsreihe des Wildtyps verglichen (Abb. 3). Die Untereinheiten Cytochrom f, Cytochrom b_6 , das Rieske-FeS-Protein und die PetD-Untereinheit des Cytochrom b_6f -Komplexes sind in der Mutante *hcf153* auf ca. 25% und in der Mutante *hcf164* auf weniger als 10% des Wildtyp-Niveaus reduziert. Da in beiden Mutanten die Spiegel der einzelnen Untereinheiten jeweils im gleichen Ausmaß reduziert sind, ist davon auszugehen, daß jeweils der komplette Cytochrom b_6f -Komplex reduziert ist. Die Untereinheiten PsaA/B und PsaD des PS I akkumulieren bei *hcf153* in normalen Mengen, während sie bei *hcf164* auf 30-50% der Wildtyp-Mengen reduziert sind. Für die Untereinheiten CP47, D2 und Cytochrom b_{559} des PS II ergab sich ein ähnliches Bild: bei *hcf153* ist keine Reduktion zu beobachten und in der Mutante *hcf164* sind diese Proteine auf 50-70% des Wildtyp-Niveaus reduziert.

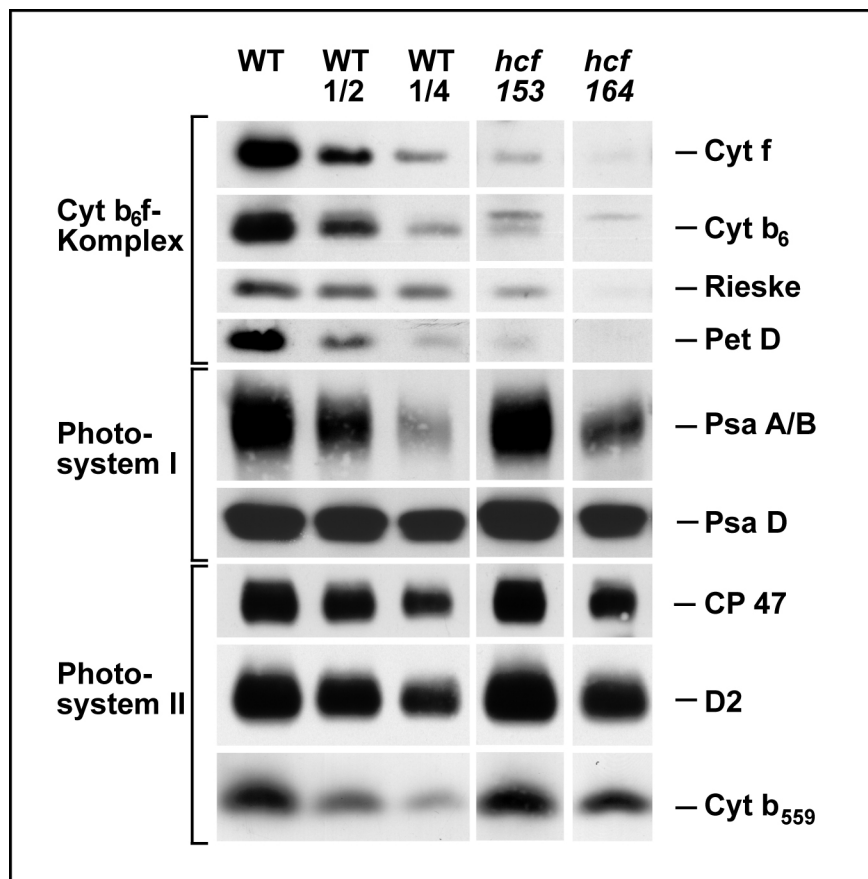


Abb. 3: Immunoblot-Analyse von Thylakoidmembranproteinen der Mutanten *hcf153* und *hcf164* im Vergleich zum Wildtyp. 8 μ g (*hcf153*, *hcf164*, WT), 4 μ g (WT 1/2) und 2 μ g (WT1/4) Membranproteine wurden über SDS- Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt, auf Nitrocellulose-Membranen transferiert und mit Antiseren gegen die folgenden Proteine immunodetektiert: Cytochrom f (Cyt f), Cytochrom b_6 (Cyt b_6), das Rieske-FeS-Protein (Rieske) und die Untereinheit PetD des Cytochrom b_6f Komplexes, die Untereinheiten PsaA/B und PsaD des Photosystems I, das innere Antennenprotein CP47 und die Reaktionszentrumproteine D2 und Cytochrom b_{559} (Cyt b_{559}) des Photosystems II.

Die reduzierten Spiegel der PS I- und PS II-Untereinheiten in der Mutante *hcf164* wurden jedoch nicht beobachtet, wenn die Pflanzen unter Schwachlichtbedingungen angezogen (2-5 μ mol/m²/s) wurden, während die drastische Reduktion der Untereinheiten des Cytochrom b_6f -Komplexes weiterhin zu sehen war (Henning Plücken, pers. Mitteilung). Dies läßt den Schluß zu, daß die verminderten Akkumulationen der beiden Photosysteme auf einen Sekundäreffekt zurückzuführen sind, der durch den Defekt des Cytochrom b_6f -Komplexes verursacht wird.

III.1.3 Die Transkriptmuster der Untereinheiten des Cytochrom b_6f -Komplexes sind in den Mutanten nicht verändert

Um zu untersuchen, ob die reduzierten Spiegel der Untereinheiten des Cytochrom b_6f -Komplexes auf eine verringerte Akkumulation der entsprechenden Transkripte zurückzuführen sind, wurden Northern-Analysen mit RNA aus den Mutanten und dem Wildtyp durchgeführt (Abb. 4). Dabei wurden Sonden für die vier großen Untereinheiten des Cytochrom b_6f -Komplexes verwendet. Die plastidär kodierten Gene *petA* (Cytochrom f), *petB* (Cytochrom b_6) und *petD* (PetD-Untereinheit) sind in polycistronischen Transkriptionseinheiten organisiert, so daß sich hierfür komplexe RNA-Muster ergeben. *PetA* stammt aus dem *petA*-Operon (Gray, 1992) und *petB* sowie *petD* stammen aus dem *psbB*-Operon (Barkan, 1988; Westhoff und Herrmann, 1988) Demgegenüber liefert das nukleär kodierte *PetC* (Rieske-FeS-Protein) ein monocistronisches Transkript. In beiden Mutanten unterscheiden sich weder die Spiegel noch die Muster der Transkripte von denen im Wildtyp. Dies zeigt, daß der Verlust der Untereinheiten des Cytochrom b_6f -Komplexes nicht durch Defekte in der Transkription, der RNA-Prozessierung oder der RNA-Stabilität verursacht werden. Vielmehr wirkt sich die Mutation auf der Ebene der Translation oder der Proteinstabilität aus.

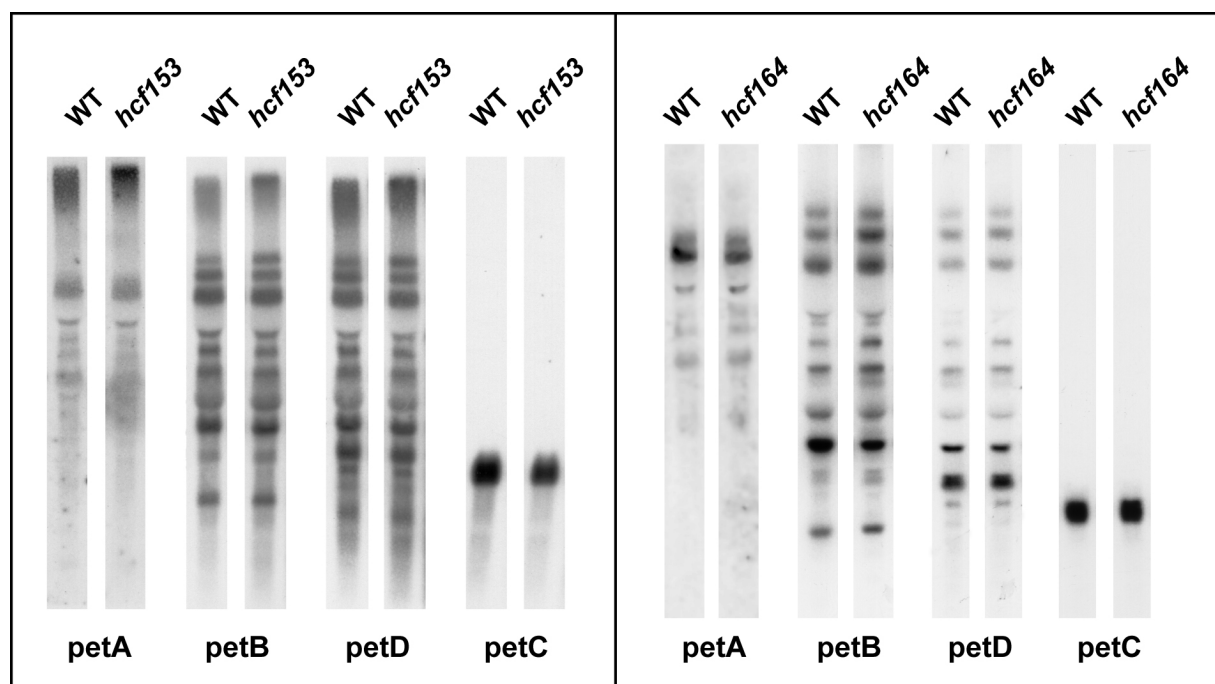


Abb. 4: Northern-Analysen der Mutanten *hcf153* und *hcf164* im Vergleich zum Wildtyp. Es wurden jeweils 8 µg Gesamt-RNA eingesetzt und mit Sonden für die plastidären Transkripte *petA* (Cytochrom f), *petB* (Cytochrom b_6) und *petD* (Untereinheit Pet D) sowie für das nukleäre Transkript *petC* (Rieske-FeS-Protein) hybridisiert.

III.1.4 Plastidär kodierte Untereinheiten des Cytochrom b_6f -Komplexes werden in den Mutanten synthetisiert

Um zu ermitteln, ob die Ursache für die verminderte Akkumulation der Untereinheiten des Cytochrom b_6f -Komplexes in verringerten Translationsraten oder verringerten Proteinstabilitäten liegt, wurden die Proteinsyntheseraten der plastidär kodierten Thylakoidmembranproteine mittels *in-vivo*-Protein-Markierungs-Experimenten mit [35 S]-Methionin analysiert (s. II.6.10). Dabei wurde zur Hemmung der cytoplasmatischen Translation Cycloheximid zugesetzt und Primärblätter der Mutanten *hcf153* und *hcf164* und des Wildtyps für 30 min markiert. Die Gesamtmuster der Proteinmarkierung der beiden Mutanten sind vergleichbar mit dem Wildtyp (Abb. 5A). Auch die Syntheserate entspricht bei *hcf153* dem Wildtyp, während sie bei *hcf164* auf ca. 70% reduziert ist.

Da man die Untereinheiten des Cytochrom b_6f -Komplexes in diesen Mustern jedoch nicht eindeutig identifizieren kann, wurden Immunopräzipitationsexperimente durchgeführt. Dabei konnten die Untereinheiten Cytochrom f und PetD mit Hilfe spezifischer Antiseren präzipitiert werden. Die Präzipitation von Cytochrom b_6 war allerdings mit den zur Verfügung stehenden Antiseren weder im Wildtyp noch in den Mutanten erfolgreich. Abb. 5B zeigt, daß die Spiegel an radioaktiv markiertem Cytochrom f in der Mutante *hcf153* auf 75% und bei *hcf164* auf 60% reduziert sind. Für radioaktiv markiertes PetD ergibt sich bei *hcf153* eine Reduktion auf 90% und bei *hcf164* eine Verminderung auf 70% im Vergleich zum Wildtyp. Die hier beobachteten Reduktionen der Untereinheiten Cytochrom f und PetD erreichten jedoch bei weitem nicht die drastischen Reduktionen auf 25% bei *hcf153* und auf 10% bei *hcf164*, die in den Immunoblot-Analysen gefunden wurden. Daraus kann man schließen, daß beide Mutationen nicht die Syntheserate der Untereinheiten des Cytochrom b_6f -Komplexes sondern vielmehr deren Proteinstabilität beeinflussen.

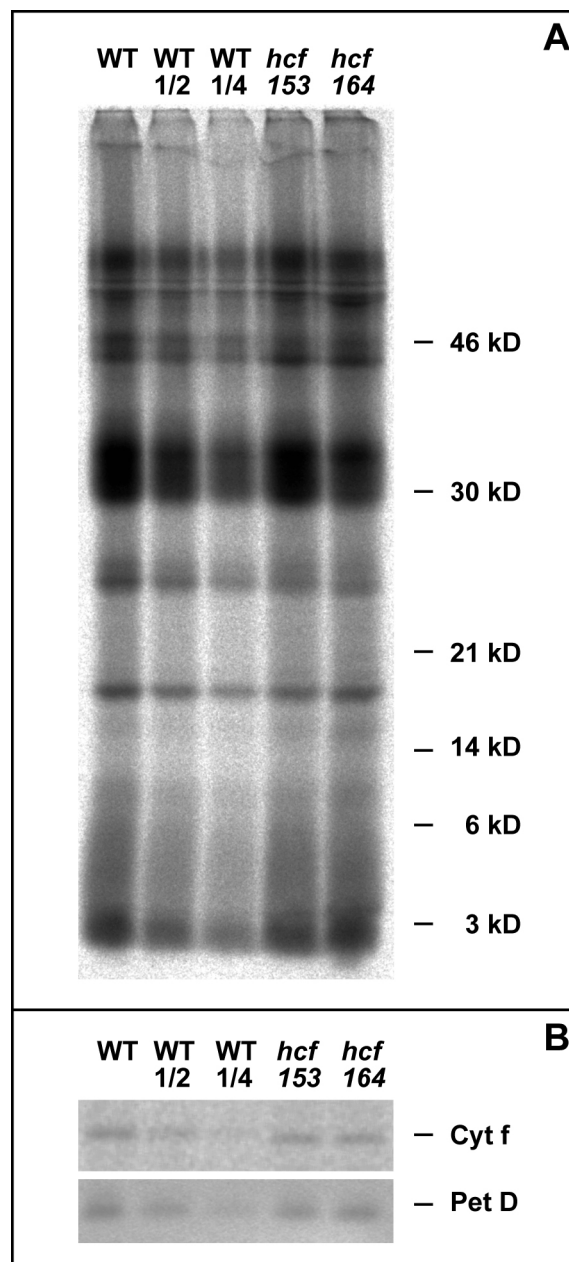


Abb. 5: *In vivo*-Proteinsynthese in den Mutanten *hcf153* und *hcf164* sowie in Wildtyp-Pflanzen. Primärblätter von 15 Tage alten Pflanzen wurden 30 min mit [35 S]-Methionin radioaktiv markiert. **(A)** Die Membranproteine wurden wie in Material und Methoden beschrieben isoliert, über SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt und mittels Autoradiografie der getrockneten Gele analysiert. Aufgetragen wurden Proteinmengen entsprechend 100.000 c.p.m. eingebauter Radioaktivität bzw. die angegebenen Verdünnungen des Wildtyps. **(B)** Die Membranproteine wurden solubilisiert und Proteinmengen entsprechend 200.000 c.p.m. eingebauter Radioaktivität wurden für die Immunpräzipitationen mit Antiseren gegen Cytochrom f bzw. gegen die PetD-Untereinheit eingesetzt. Aufgetragen wurden 50% der jeweiligen Immunpräzipitation in den Bahnen WT, *hcf153* und *hcf164* sowie 25% bzw. 12.5% der Wildtyp-Immunpräzipitation in den Bahnen WT 1/2 bzw. WT1/4.

III.2 Isolierung und Verifizierung der von den Mutationen betroffenen Gene *HCF153* und *HCF164*

Für die Isolation der cDNAs der betroffenen Gene *HCF153* und *HCF164* mußte zunächst die Kopplung von T-DNA-Insertion und Mutation nachgewiesen werden. Mit Hilfe der inversen PCR konnten dann die T-DNA-angrenzenden genomischen Bereiche aus beiden Mutanten isoliert werden und die jeweilige cDNA bei *hcf153* mittels Sichtung einer *Arabidopsis*-cDNA-Bank sowie bei *hcf164* über Reverse-Transkriptions-PCR isoliert werden. Anschließend wurde die Identität der isolierten cDNAs über die Komplementation der jeweiligen Mutante nachgewiesen. Schließlich wurden die isolierten cDNAs als Sonden in Northern-Analysen benutzt, um die Expression der betroffenen Gene in den Mutanten zu untersuchen.

III.2.1 Die Mutationen sind jeweils mit der T-DNA Insertion gekoppelt

Da bei der Erzeugung von T-DNA-Insertionsmutanten in der Regel mehrere T-DNAs in das Genom der Pflanze inseriert werden (Frosthoefel *et al.*, 1992), versucht man T-DNAs, die nicht mit der Mutation segregieren durch Rückkreuzungen mit dem Wildtyp zu eliminieren. In der F₂-Generation der rückgekreuzten Mutanten *hcf153* und *hcf164* wurde nun über Segregationsanalysen der durch die T-DNA vermittelten Basta-Resistenz und des *hcf*-Phänotyps untersucht, ob eine oder mehrere T-DNA-Insertionen vorliegen und ob Mutation und T-DNA-Insertion gekoppelt sind (Tab. 5).

Mutante	Anzahl	Aufspaltung Resistenz			Aufspaltung Mutation der Basta ^R		
		% Basta ^S	% Basta ^R	Chi ²	% <i>hcf</i>	% WT	Chi ²
<i>hcf153</i>	484	22	78	2.482	34	66	0.012
<i>hcf164</i>	401	27	73	0.606	36	64	0.015

Tabelle 5: Segregationsanalyse von Herbizidresistenz und Mutation. Die Aufspaltung von Resistenz und *hcf*-Phänotyp wurde in der F₂-Generation der rückgekreuzten Mutanten *hcf153* und *hcf164* ermittelt. Im Chi²-Test wurde die Abweichung der erhaltenen von der erwarteten Aufspaltung berechnet. Dabei können Werte < 3,8 ($P \geq 0,05$) akzeptiert werden. Eine Abweichung der Aufspaltung ist statistisch signifikant, wenn $P < 0,05$ ist.

Bei einem einzelnen T-DNA-Insertionsort wurde bezüglich der Basta-Resistenz eine Aufspaltung von 3:1, d.h. 75% Basta-Resistente erwartet. Der Anteil der resistenten Pflanzen lag bei *hcf153* bei 78% und bei *hcf164* bei 73%, was bedeutet, daß in beiden Mutanten eine einzelne T-DNA-Insertion vorliegt. Bei einer rezessiven nukleären Mutation wurde eine Aufspaltung von 1:3, d.h. 25% Pflanzen mit *hcf*-Phänotyp erwartet. Bei einer engen

Kopplung von T-DNA und Mutation müssen sich diese 25% Mutanten außerdem in der Gruppe der Basta-Resistenten wiederfinden, wo sie dann eine Aufspaltung von 1:2 zeigen, d.h. 33% ausmachen. Innerhalb der Basta-Resistenten findet man bei *hcf153* 34% und bei *hcf164* 36% Mutanten, was bedeutet, daß T-DNA-Insertion und Mutation gekoppelt sind.

Bei der T-DNA-Insertionsmutagenese kommt es häufig vor, daß an einem Insertionsort mehrere T-DNAs hintereinander inseriert werden (Jones *et al.*, 1987; Jorgensen *et al.*, 1987). Um zu ermitteln, ob sich am T-DNA-Insertionsort eine einzelne T-DNA befindet oder ob mehrere T-DNAs nebeneinander vorliegen, wurde genomische DNA aus beiden Mutanten isoliert, mit *EcoRI* und *PstI* verdaut und in einer Southern-Analyse mit Sonden der rechten (RB) und linken (LB) Grenzsequenzen der T-DNA hybridisiert. Eine Restriktionskarte der T-DNA mit der Position der verwendeten Sonden ist in Abb. 6 dargestellt.

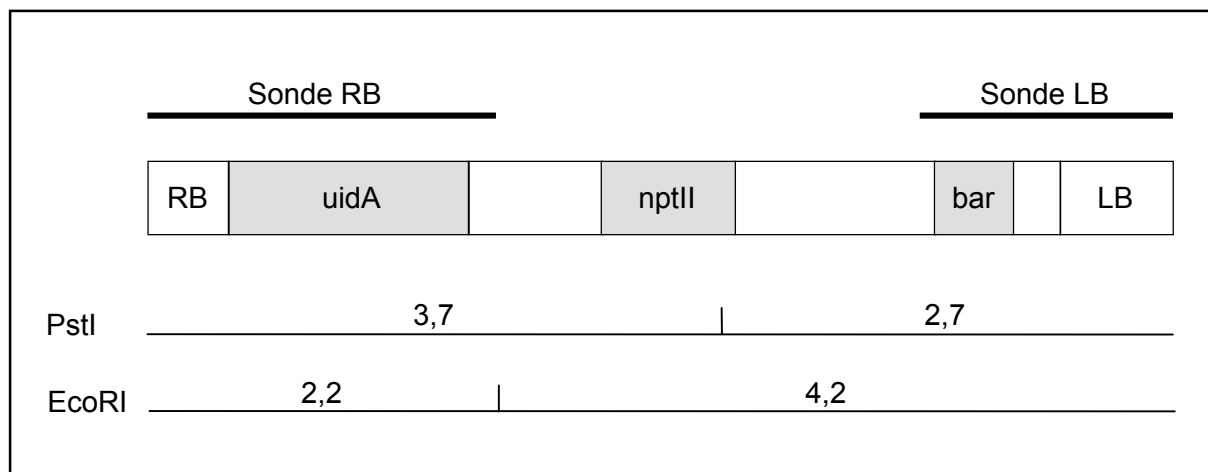


Abb. 6: Restriktionskarte der T-DNA aus dem Transformationsvektor pGKB5. Die Gene uidA für die β -Glucuronidase, nptII für die Kanamycinresistenz und bar für die Bastaresistenz sind eingezeichnet. Außerdem ist die Position der Sonden für die rechte und linke T-DNA-Grenze dargestellt. Die Größen der Restriktionsfragmente sind in kb angegeben.

		<i>hcf153</i>	<i>hcf164</i>
Sonde	Restriktionsenzym	detektiertes Fragment	detektiertes Fragment
Sonde RB	<i>EcoRI</i>	7.0 = 2.2 + 4.8	6.0 = 2.2 + 3.8
	<i>PstI</i>	10.2 = 3.7 + 6.5	11.0 = 3.7 + 7.3
Sonde LB	<i>EcoRI</i>	4.6 = 4.2 + 0.4	5.8 = 4.2 + 1.6
	<i>PstI</i>	4.4 = 2.7 + 1.7	5.4 = 2.7 + 2.7

Tabelle 6: Genomische Southern-Analyse der T-DNA-Insertion in den Mutanten *hcf153* und *hcf164*. *EcoRI*- und *PstI*-geschnittene genomische DNA der Mutanten wurde mit Sonden gegen die rechte (RB) und linke (LB) Grenzsequenz der T-DNA hybridisiert. Angegeben ist jeweils die Größe des detektierten Fragments, der darin enthaltene Anteil der T-DNA und der darin enthaltene Anteil der genomischen Sequenzen (x kb Gesamtfragment = y kb T-DNA-Anteil + z kb genomische DNA).

In *hcf153* und auch in *hcf164* wird von beiden Sonden jeweils ein einzelnes Restriktionsfragment detektiert, das sich jeweils aus einem entsprechenden internen T-DNA-Anteil und einem Anteil genomischer Sequenz zusammensetzt (Tab. 6). Dies bedeutet, daß in beiden Mutanten jeweils eine einzelne T-DNA am Insertionsort vorliegt.

III.2.2 Isolierung der T-DNA angrenzenden genomischen Bereiche in *hcf153* und *hcf164* über inverse PCR

Da T-DNA-Insertion und Mutation in beiden Mutanten gekoppelt sind und am Insertionsort jeweils eine einzelne T-DNA vorliegt, bot sich die Technik der inversen PCR (Ochman *et al.*, 1993) an, um die T-DNA angrenzenden genomischen Bereiche aus den beiden Mutanten zu isolieren (s. II.4.3). Für den dafür erforderlichen Restriktionsverdau wurde bei *hcf153* *Pst*I ausgewählt, welches laut Southern-Analyse (Tab. 6) an der linken T-DNA-Grenze ein Fragment von 4.4 kb liefert, das sich aus 2.7 kb T-DNA-Sequenz und 1.7 kb genomischer Sequenz zusammensetzt. Nach erfolgter Selbstligation, lieferte die PCR-Amplifizierung mit den Primern LB TAG 5 und 11 ein Produkt von 2.0 kb. Die Reamplifizierung mit den inneren Primern LB TAG 13 und 14 lieferte wie erwartet ein Produkt von 1.9 kb.

Bei der Mutante *hcf164* wurde für den Restriktionsverdau *Eco*RI verwendet, wobei an der linken T-DNA-Grenze ein Fragment von 5.8 kb entsteht, das aus 4.2 kb T-DNA-Sequenz und 1.6 kb genomischer DNA besteht. Die Erstamplifizierung mit den Primern LB TAG 5 und 17 lieferte ein Fragment von 2.1 kb und die Reamplifizierung mit den Primern LB TAG 14 und 18 eines von 1.8 kb.

Die jeweiligen Produkte der Reamplifizierung wurden in den Vektor pBluescript KSII+ kloniert und lieferten die Klone pnAt-HCF153 und pnAt-HCF164. Sie wurden mit den vektorspezifischen Primern T3 und T7 von beiden Enden her ansequenziert. Dabei ergaben die Sequenzdaten bei beiden Klonen das erwartete Bild für einen spezifischen iPCR-Klon der linken T-DNA-Grenze: am 5'-Ende befindet sich die linke Grenzsequenz der T-DNA, dann folgt genomische Sequenz bis zur Schnittstelle des benutzten Restriktionsenzym und anschließend findet man wieder die erwartete T-DNA-Sequenz.

III.2.3 Isolierung der *HCF153*-cDNA über Sichtung einer *Arabidopsis*-cDNA-Bank und anschließendes 5'-RACE

Das in dem Klon pnAt-HCF153 enthaltene iPCR-Fragment wurde zur Sichtung einer cDNA-Bank von *Arabidopsis thaliana* eingesetzt (s. II.3.4). Dabei wurden 21 cDNA-Klone isoliert, von denen sich nach Southern-Analyse und Sequenzierung vier als spezifisch herausstellten (vergl. Lennartz, 1997). Alle Klone waren vom 3'-Ende her vollständig und zueinander identisch, aber auch der längste von ihnen mit einer Größe von 561 Basen besaß kein

vollständiges 5'-Ende. Deshalb wurde mittels 5'-RACE wie unter II.3.5 beschrieben mit Hilfe der sequenzspezifischen 3'-Primer At153-2 für die Erstamplifizierung und At153-3 für die Reamplifizierung der fehlende 5'-Bereich amplifiziert. Der aus der cDNA-Bank isolierte Klon und der im 5'-RACE isolierte Klon besaßen eine Sequenzüberlappung, in der sich eine singuläre *Hind*III-Schnittstelle befand. Diese wurde benutzt, um beide Fragmente miteinander zu fusionieren. Anschließend wurde das Fusionsfragment in den Vektor pBluescript KSII+ kloniert, woraus der Vollängen-cDNA-Klon pcAt-HCF153 mit einer Länge von 623 Basen hervorging. Dieser Klon wurde doppelsträngig sequenziert. Die Sequenz ist in Abb. 7 aufgeführt. Datenbanksuchen mit dieser cDNA-Sequenz lieferten eine 100%ige Sequenzübereinstimmung mit einem postulierten Gen auf Chromosom IV von *Arabidopsis thaliana* in einem Bereich, der durch den BAC-Klon F3L17 abgedeckt wird (EMBL Acc.-Nr. AL080283.1, CAB45915.1). Dieses Gen ist 0.8 kb lang und enthält ein Intron.

CC	AAA	ATA	AAA	ATC	ATG	GCG	AGA	CTT	TTC	GTC	TCT	ATC	CCT	ATG	CAA	CCC	ACA	CAA	ATA	AGC	TTC	65
			11			20			29			38			47			56				
P	A	S	S	S	Q	P	L	L	S	P	P	A	N	N	F	T	D	G	G	A	G	
CCT	GCG	TCT	TCT	TCT	CAG	CCA	CTA	TTA	TCT	CCG	CCG	GCG	AAC	AAT	TTC	ACC	GAT	GGT	GGA	GCT	GGG	
		74			83			92			101			110			119			128		
G	L	C	L	T	R	R	I	R	D	S	S	V	V	T	R	A	G	P	S	T	S	
GGA	TTA	TGT	CTT	ACA	CGG	AGA	ATC	AGA	GAC	AGT	TCC	GTG	GTG	ACG	CGA	GCA	GGG	CCT	AGT	ACG	AGC	
	137			146			155			164		173			182			191				
S	Y	L	L	A	F	A	I	P	A	T	L	I	A	A	T	V	F	T	S	I	K	
AGC	TAC	TTG	CTC	GCG	TTC	GCC	ATT	CCT	GCT	ACT	CTT	ATC	GCC	GCC	ACT	GTC	TTC	ACT	TCA	ATC	AAA	
	200		209			218			227			236			245			254			263	
I	A	D	K	L	D	E	D	F	L	E	D	I	A	L	N	Q	A	I	K	A	A	
ATC	GCT	GAC	AAA	CTC	GAC	GAA	GAT	TTC	CTT	GAG	GAT	ATT	GCG	TTG	AAC	CAA	GCG	ATA	AAA	GCA	GCA	
	272			281			290			299			308			317			326			
E	K	G	E	N	G	E	G	D	I	S	L	D	D	V	I	Q	E	P	V	L	Q	
GAA	AAG	GGA	GAG	AAT	GGA	GAA	GGT	GAT	ATC	TCA	CTG	GAC	GAT	GTG	ATT	CAA	GAA	CCT	GTG	CTT	CAA	
	335			344			353			362			371			380			389			
R	T	R	N	R	P	K	R	E	V													
CGA	ACA	CGT	AAC	CGG	CCT	AAA	CGT	GAA	GTT	TAA	AAA	CGC	ACA	CAC	AGC	TTC	TTC	ATG	ATG	GGA	ATA	
	398		407			416			425			434			443			452			461	
GAC	GTT	GTA	ACT	GTA	ATA	CAT	GTT	GTG	TTT	TGT	ATA	AGA	AAA	TTT	AAG	CGT	GTA	GCC	TTT	CCT	AGT	
	470			479			488			497			506			515			524			
CCC	GTT	TAT	AGT	TGT	AGT	TAC	TGG	TTT	TAC	ATT	ACC	GTT	TGA	TCA	TTT	TGT	AAA	GAA	AAA	ACG	GAT	
	533			542			551			560			569			578			587			
GAT	GAA	TCA	AAA	ACC	TCA	TTA	CAG	TTA	CCA													
	596		605			614			623													

Abb. 7: Nukleotid- und abgeleitete Aminosäuresequenz der HCF153-cDNA.

III.2.4 Isolierung der *HCF164*-cDNA über Reverse-Transkriptions-PCR

Datenbanksuchen mit der Sequenz des iPCR-Klons pnAt-HCF164 lieferten eine 100%ige Sequenzübereinstimmung mit einem postulierten Gen auf Chromosom IV von *Arabidopsis thaliana* und zwar in dem durch den BAC-Klon AP21 abgedeckten Bereich (EMBL Acc.-Nr. Z99707, CAB16778.1). Dieses Gen besitzt eine Größe von 1.4 kb und enthält drei Introns. Die Sequenzinformation wurde genutzt, um die Primer At164-F und At164-R abzuleiten. In einer reversen Transkriptions-PCR wurde ausgehend von Poly(A⁺)-RNA des Ökotypen Wassilewskija mit Hilfe dieser Primer die cDNA des Gens *HCF164* gewonnen (s. II.3.3).

M	A	R	L	V	F	S	L	N	L	P	S	S	H	G	F	N	L	S	P	R	
ACG	ATG	GCT	CGC	TTA	GTA	TTT	TCT	TTA	AAC	CTT	CCA	TCT	AGT	CAT	GGA	TTC	AAT	CTC	AGT	CCT	CGA
		11		20				29			38		47			56			65		
N	L	Q	S	F	F	V	T	Q	T	G	A	P	R	F	R	A	V	R	C	K	P
AAT	CTT	CAA	TCT	TTC	TTC	GTT	ACC	CAA	ACA	GGA	GCT	CCA	CGA	TTT	CGC	GCT	GTT	CGT	TGC	AAA	CCA
	74			83			92			101			110			119			128		
N	P	E	S	S	E	T	K	Q	E	K	L	V	I	D	N	G	E	T	S	S	A
AAC	CCA	GAA	TCT	TCC	GAA	ACC	AAA	CAG	GAG	AAA	TTG	GTA	ATA	GAT	AAT	GGT	GAA	ACT	TCA	TCT	GCA
	137		146			155		164			173			182			191			200	
S	K	E	V	E	S	S	S	S	V	A	D	S	S	S	S	S	S	S	G	F	P
TCG	AAG	GAA	GTG	GAA	TCA	TCA	TCA	TCT	GTT	GCT	GAC	TCT	TCT	TCT	TCT	TCT	TCT	TCG	GGA	TTC	CCT
	209				218			227			236			245			254			263	
E	S	P	N	K	D	I	N	R	R	V	A	A	V	T	V	I	A	A	L	S	L
GAA	TCT	CCC	AAT	AAG	GAT	ATC	AAT	AGA	AGA	GTT	GCG	GCT	GTT	ACT	GTA	ATC	GCG	GCT	TTG	TCG	TTA
	272			281			290			299			308			317			326		
F	V	S	T	R	L	D	F	G	I	S	L	K	D	L	T	A	S	A	L	P	Y
TTT	GTA	TCG	ACA	AGG	CTC	GAT	TTT	GGG	ATT	TCT	TTG	AAG	GAT	TTA	ACC	GCT	TCT	GCG	TTG	CCT	TAC
	335		344			353			362			371			380			389			398
E	E	A	L	S	N	G	K	P	T	V	V	E	F	Y	A	D	W	C	E	V	C
GAG	GAG	GCG	TTA	TCG	AAT	GGG	AAG	CCG	ACT	GTT	GTT	GAG	TTC	TAT	GCA	GAT	TGG	TGT	GAA	GTT	TGT
	407			416			425			434			443			452			461		
R	E	L	A	P	D	V	Y	K	I	E	Q	Q	Y	K	D	K	V	N	F	V	M
CGA	GAA	CTA	GCT	CCT	GAT	GTT	TAT	AAA	ATC	GAG	CAG	CAA	TAC	AAG	GAC	AAA	GTT	AAC	TTT	GTG	ATG
	470			479			488			497			506			515			524		
L	N	V	D	N	T	K	W	E	Q	E	L	D	E	F	G	V	E	G	I	P	H
CTA	AAT	GTG	GAC	AAC	ACG	AAA	TGG	GAG	CAA	GAG	TTG	GAT	GAG	TTT	GGT	GTT	GAG	GGT	ATT	CCT	CAT
	533		542			551			560			569			578			587			596
F	A	F	L	D	R	E	G	N	E	E	G	N	V	V	G	R	L	P	R	Q	Y
TTC	GCC	TTC	CTC	GAT	AGA	GAA	GGG	AAC	GAA	GAA	GGT	AAT	GTG	GTC	GGG	AGG	CTC	CCA	AGA	CAG	TAT
	605			614			623			632			641			650			659		
L	V	E	N	V	N	A	L	A	A	G	K	Q	S	I	P	Y	A	R	A	V	G
TTA	GTT	GAA	AAT	GTG	AAT	GCG	CTT	GCA	GCC	GGG	AAA	CAA	TCA	ATT	CCT	TAT	GCC	CGA	GCC	GTG	GGA
	668			677			686			695			704			713			722		
Q	Y	S	S	S	E	S	R	K	V	H	Q	V	T	D	P	L	S	H	G		
CAG	TAC	TCA	AGC	TCA	GAG	TCT	CGT	AAG	GTG	CAT	CAG	GTT	ACT	GAT	CCC	TTA	AGC	CAT	GGA	TAA	AGA
	731		740			749			758			767			776			785			794
GAG	TGG	CAT	CAC	TAT	CAT	GC															
		803			812																

Abb. 8: Nukleotid- und abgeleitete Aminosäuresequenz der *HCF164*-cDNA.

Da die beiden Primer jeweils mit einer *Bam*HI-Schnittstelle ausgestattet waren, wurde das PCR-Produkt in die *Bam*HI-Schnittstelle des Vektors pBluescript KSII+ kloniert. Der dabei erhaltene cDNA-Klon pcAt-HCF164 mit einer Länge von 814 Basen wurde doppelsträngig sequenziert. Die Sequenz ist in Abb. 8 aufgelistet.

III.2.5 Die Mutationen in *hcf153* und *hcf164* werden durch die Transformation mit der jeweiligen cDNA komplementiert

Um zu beweisen, daß die Zerstörung der Gene *HCF153* bzw. *HCF164* tatsächlich jeweils für den mutanten Phänotyp verantwortlich ist, wurden Komplementationsexperimente mit den isolierten cDNAs wie unter II.9 beschrieben durchgeführt. Dazu wurden die cDNAs aus den Plasmiden pcAt-HCF153 und pcAt-HCF164 jeweils mit dem 35S-Promotor des Cauliflower Mosaik Virus im Pflanzentransformationsvektor pPCV91 fusioniert. Diese Konstrukte wurden jeweils in den *Agrobacterium tumefaciens*-Stamm GV3101 eingebracht und anschließend über Agrobakterien-vermittelte Wurzeltransformation in die Mutanten *hcf153* bzw. *hcf164* geschleust. Dazu wurden Wurzeln von zwei Wochen alten Mutanten, die zuvor über UV-Sichtung und Chlorophyll-Fluoreszenzmessungen eindeutig als homozygot identifiziert worden waren, mit den entsprechenden Agrobakterien infiziert. Für die Mutante *hcf153* konnten schließlich 35 und für die Mutante *hcf164* 45 unabhängige Pflanzen aus den Wurzelstückchen regeneriert und auf Erde zur Samenbildung gebracht werden. Diese Pflanzen zeigen nicht länger einen hcf-Phänotyp und in Chlorophyll-Fluoreszenzmessungen konnte gezeigt werden, daß sie den für Wildtyp-Pflanzen typischen Kurvenverlauf liefern (Abb. 9). Zur Kontrolle waren beide Mutanten auch mit dem leeren Vektor pPCV91 transformiert worden. Die daraus gewonnenen Regenerate konnten nicht auf Erde erhalten werden und zeigten außerdem weiterhin den mutanten Phänotyp. Diese Experimente zeigen, daß die *HCF153*-cDNA bzw. die *HCF164*-cDNA in der Lage sind, die jeweilige Mutante zu komplementieren. Daraus läßt sich ableiten, daß die T-DNA-Insertion in die Gene *HCF153* und *HCF164* jeweils für den mutanten Phänotyp verantwortlich ist und außerdem beide isolierten cDNAs ein funktionelles Protein kodieren.

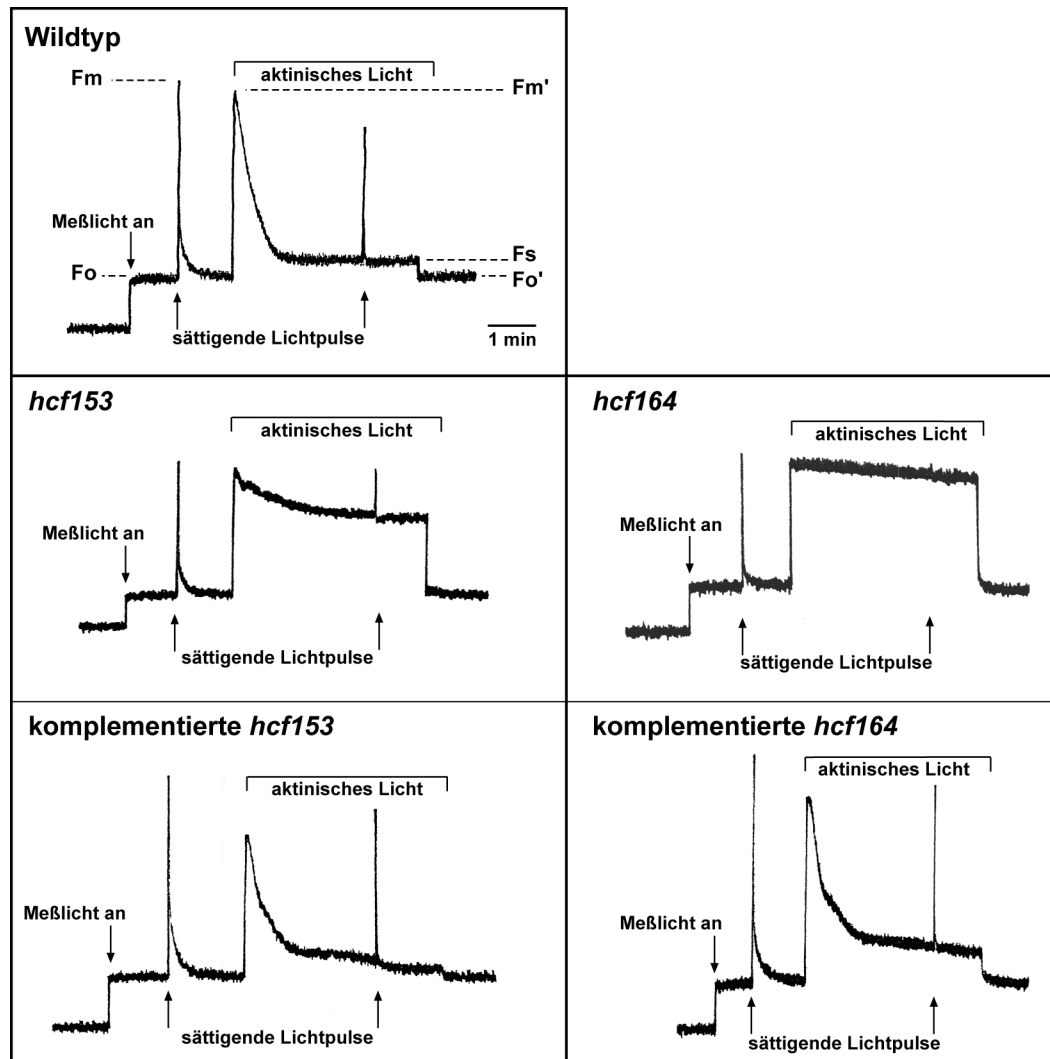


Abb. 9: Komplementation der Mutanten *hcf153* und *hcf164* mit der jeweiligen cDNA. Die *HCF153*- bzw. *HCF164*-cDNA wurde unter die Kontrolle des 35S-Promotors des Cauliflower Mosaik Virus gestellt und über Agrobakterien-vermittelte Wurzeltransformation in die jeweilige Mutante eingebracht. Bei den regenerierten Pflanzen wurde die Komplementation mittels Chlorophyll-Fluoreszenz-Induktionsmessungen bestätigt.

III.2.6 Die T-DNA-Insertion in der Mutante *hcf153* führt zu einem veränderten Transkript des Gens *HCF153*

Vergleichende Sequenzanalysen des iPCR-Klons pnAt-HCF153 und des cDNA-Klons pcAt-HCF153 ergaben, daß die T-DNA 94 Basen vor dem 3'-Ende der cDNA in das Gen *HCF153* inseriert ist. Um den Effekt der T-DNA-Insertion auf die Expression des betroffenen Gens in der Mutante zu untersuchen, wurden Northern-Analysen mit Poly(A⁺)-RNA aus homozygoten Mutanten, heterozygoten Pflanzen und Wildtyp-Pflanzen durchgeführt, wobei die *HCF153*-cDNA als Sonde eingesetzt wurde (Abb. 10).

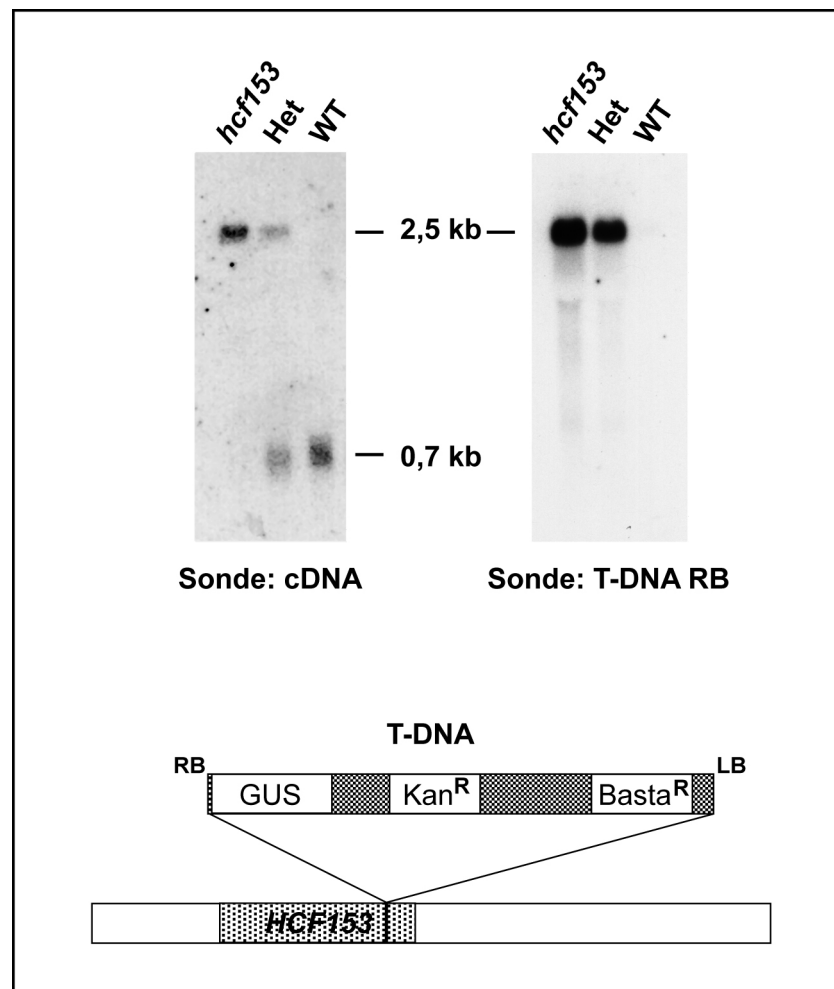


Abb. 10: Northern-Analyse mit RNA aus Wildtyp-Pflanzen (WT), heterozygoten Pflanzen (Het) und homozygoten *hcf153* Mutanten. 10 µg Poly (A⁺)-RNA von drei Wochen alten Pflanzen wurden auf einem denaturierenden Agarosegel aufgetrennt, auf Nylonmembranen transferiert und mit Sonden gegen die *HCF153*-cDNA sowie gegen die rechte T-DNA Grenze hybridisiert. Die Skizze zeigt die T-DNA-Insertion in das Gen *HCF153* abgeleitet aus den Sequenzdaten des iPCR-Klons und der cDNA.

Im Wildtyp wurde ein Transkript von 0.7 kb und in der Mutante eines von 2.5 kb detektiert. In den heterozygoten Pflanzen findet man beide Transkripte. Das Transkript von 2.5 kb ist dadurch erklärbar, daß in der Mutante zunächst das Gen *HCF153* bis zum Ort der T-DNA-Insertion abgelesen wird und dann weiter in die T-DNA hereingelesen wird. An der rechten Grenze der T-DNA befindet sich ein GUS-Reportergen mit einer Länge von 1.8 kb, das demnach komplett mitabgelesen wird. Die Rehybridisierung des Filters mit einer Sonde für die rechte Grenzsequenz der T-DNA detektiert in der Mutante und in den heterozygoten Pflanzen ebenso das 2.5 kb-Transkript und bestätigt damit, daß ein solches Fusionstranskript gebildet wird.

III.2.7 Die T-DNA-Insertion in der Mutante *hcf164* unterbindet die Expression des Gens *HCF164*

Aus dem Vergleich der Sequenzen des iPCR-Klons pnAt-HCF164 und des cDNA-Klons pcAt-HCF164 ergab sich, daß die T-DNA in der Mutante 34 Basen vor dem ATG-Startkodon inseriert ist. Die *HCF164*-cDNA wurde daraufhin als Sonde in einer Northern-Analyse verwendet, um die Expression des Gens *HCF164* in der Mutante im Vergleich zur Expression in heterozygoten Pflanzen und im Wildtyp zu untersuchen (Abb. 11). Dabei wurde im Wildtyp ein Transkript mit einer Größe von 1.2 kb detektiert, welches sich in geringeren Mengen auch in den heterozygoten Pflanzen wiederfand. In den homozygoten Mutanten fehlt dieses Transkript gänzlich. Dieses Ergebnis zeigt, daß die T-DNA-Insertion in der Mutante die Expression des Gens *HCF164* unterbindet.

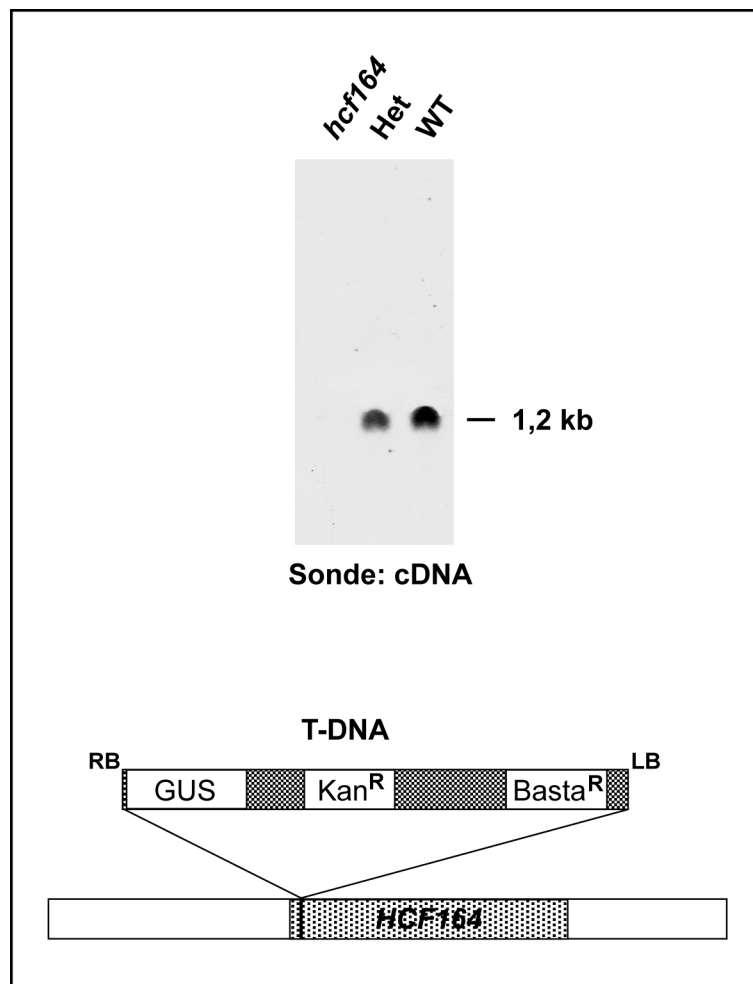


Abb. 11: Northern-Analyse der Mutante *hcf164* im Vergleich zu heterozygoten und Wildtyp-Pflanzen. Es wurden jeweils 10 µg Poly (A+)-RNA eingesetzt und mit einer Sonde gegen die *HCF164*-cDNA hybridisiert. Die Skizze zeigt die T-DNA-Insertion in das Gen *HCF164* abgeleitet aus den Sequenzdaten des iPCR-Klons und der cDNA.

III.3 Charakterisierung und Funktionsanalyse der Faktoren HCF153 und HCF164

Um mehr über die Eigenschaften der von den Genen *HCF153* und *HCF164* kodierten Faktoren zu erfahren wurde ihre Struktur mittels Hydropathie-Analyse untersucht. Dazu wurde das Programm MacMollyInterpret (Softgene, Bocholt) verwendet. Hinweise auf die mögliche Funktion der beiden Faktoren sollten Ähnlichkeitssuchen mit den von der *HCF153*- bzw. *HCF164*-cDNA abgeleiteten Aminosäuresequenzen liefern. Für diese Suchen wurde der BLAST-Server des National Center for Biotechnology Information (Bethesda, USA) benutzt. Des weiteren sollten mittels Sichtung einer Arabidopsis-cDNA-Bank im Hefe-Zweihybridsystem mögliche Interaktoren der Faktoren HCF153 und HCF164 identifiziert werden. Schließlich sollte die intrazelluläre Lokalisation der beiden Faktoren auf immunologischem Wege ermittelt werden.

III.3.1 Analyse des Faktors HCF153

III.3.1.1 *HCF153* kodiert ein bislang unbekanntes Protein

Die *HCF153*-cDNA kodiert ein Protein von 137 Aminosäuren (Abb. 7) mit einem berechneten Molekulargewicht von 15 kDa. Der Hydropathie-Plot (Abb. 12) zeigt, daß sich das Protein HCF153 in drei Domänen einteilen läßt.

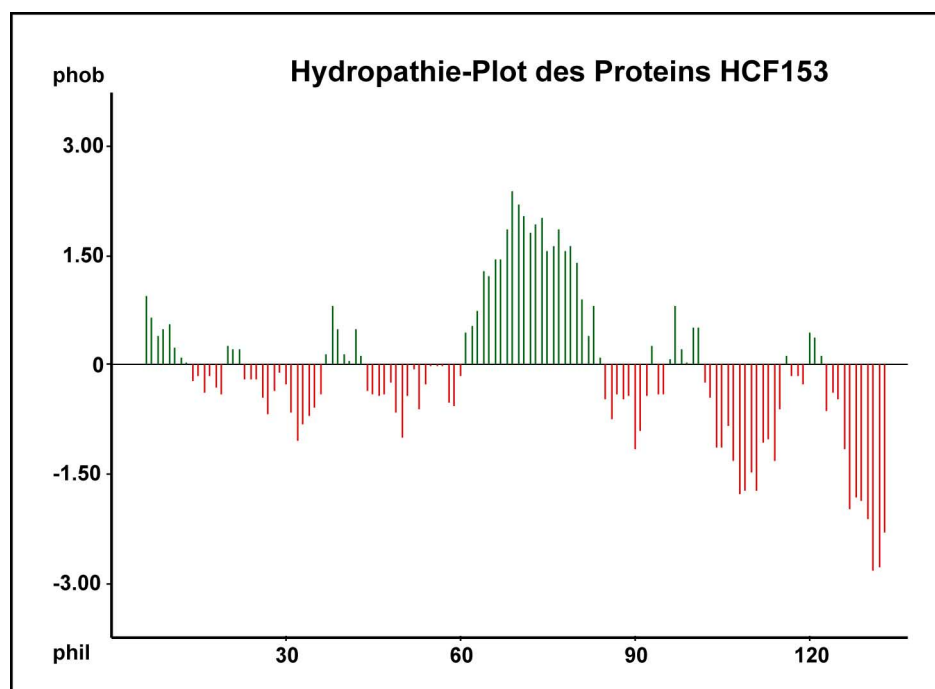


Abb. 12: Hydropathie-Analyse des Proteins HCF153.

Man findet eine N-terminale hydrophile Domäne bis zur Aminosäure 63, eine hydrophobe Region von Aminosäure 64 bis 88 und einen C-terminalen hydrophilen Bereich von Aminosäure 89 bis 137.

Die ersten 60 Aminosäuren von HCF153 zeigen verschiedene Eigenschaften, die typisch für plastidäre Transitsequenzen sind, z.B. serinreiche Abschnitte und ein Abschnitt mit unpolaren Aminosäuren am N-Terminus.

In Datenbanksuchen mit der abgeleiteten Aminosäuresequenz konnten keine signifikanten Ähnlichkeiten zum Protein HCF153 gefunden werden, die eine Aussage über die mögliche Funktion dieses Proteins zugelassen hätten.

III.3.1.2 Suche nach Interaktoren zu HCF153 im Hefe-Zweihybridsystem

Die Charakterisierung der Mutante *hcf153* ergab (s. III.1.1-4), daß das Protein HCF153 auf der posttranslationalen Ebene der Genexpression in die Biogenese des Cytochrom b_6f -Komplexes eingreift, z.B. als Hilfsfaktor für die Reifung oder Stabilität einer der Untereinheiten oder als Assemblierungsfaktor. In jedem Fall ist es denkbar, daß es dabei mit anderen Hilfsfaktoren, die ebenfalls nukleär kodiert sind, wechselwirkt. Zur Identifizierung unbekannter Proteine, die mit einem bestimmten Faktor interagieren, hat sich das Hefe-Zweihybridsystem etabliert (Fields und Sternglanz, 1994). Das zugrunde liegende Prinzip dieser Methode ist unter II.7 beschrieben. Der gesamte kodierende Bereich aus der *HCF153*-cDNA wurde in den Hefetransformationsvektor pGBT9 kloniert und in den Hefestamm PJ69-4A transformiert. Die Korrektheit des Konstrukts wurde mittels Sequenzierung überprüft. Da nach nukleär kodierten Interaktoren für das HCF153-Protein gesucht werden sollte, diente dieses Konstrukt als Köder bei der Sichtung einer *Arabidopsis*-cDNA-Bank (s. II.1.6), die im Vektor pGAD10 in den Hefestamm Y187 transformiert worden war. Köder- und Beuteplasmide wurden dazu über Kreuzung der beiden Hefestämme zusammengebracht. Die Durchführung der Kreuzung und die anschließende Selektion der diploiden Hefen auf Interaktion ist unter II.7 beschrieben. Folgende Kreuzung wurde durchgeführt: PJ69-4A mit pGBT9-HCF153 x Y187 mit pGAD10-cDNA-Bank.

Es wurden hierbei 3.3×10^8 PJ69-4A-Hefezellen mit 1.2×10^8 Y187-Hefezellen gekreuzt und lieferten bei einer Kreuzungsrate von 30% eine Gesamtzahl von 3.6×10^7 diploiden Zellen, die auf Interaktion untersucht wurden. Damit deckte die Gesamtzahl erhaltener diploider Zellen die verwendete cDNA-Bank (3×10^6 unabhängige Klone) mehrfach ab. Die eine Hälfte des Kreuzungsansatzes wurde auf Aktivierung des ADE2-Reportergens und die andere Hälfte auf Aktivierung des HIS3-Reportergens selektiert. Dabei ergaben sich 21 positive Klone. Eine reziproke Selektion dieser Klone auf die Aktivierung des jeweiligen anderen Reportergens ergab jedoch, daß es sich in allen Fällen um falsch-positive Klone handelte. Somit war die Sichtung einer *Arabidopsis*-cDNA-Bank nicht erfolgreich in der Identifizierung von nukleär kodierten Interaktionspartnern für das Protein HCF153.

III.3.1.3 Untersuchungen zur Lokalisation des HCF153-Proteins

Aus der Analyse der Aminosäuresequenz von HCF153 (s. III.3.1.1) ging hervor, daß der N-terminale Bereich des Proteins von Aminosäure 1-60 Charakteristika von plastidären Transitsequenzen aufweist. Der sich anschließende hydrophobe Teil von Aminosäure 64-88 dient dem Protein vermutlich als Membrananker. Um diese Überlegungen zu bestätigen, sollte die intrazelluläre Lokalisation des HCF153-Proteins mittels immunologischer Analysen erfolgen. Daher wurde zunächst ein Antiserum gegen rekombinantes HCF153-Protein gewonnen. Das komplette Protein HCF153 (Aminosäuren 1-137) wurde in *E.coli* wie unter II.6.1 beschrieben als GST-Fusionsprotein überexprimiert und aus den Bakterien isoliert. In einer präparativen SDS-Gelelektrophorese wurde das HCF153/GST-Fusionsprotein aus dem bakteriellen Proteinrohextrakt aufgereinigt, anschließend wurde mittels Thrombinverdau der GST-Anteil abgeschnitten und der erhaltene HCF153-Anteil mit einer zweiten präparativen SDS-Gelelektrophorese aus dem Ansatz isoliert. Das schließlich aus Kaninchen erhaltene Antiserum lieferte in Western-Analysen ein starkes Signal gegen das rekombinante HCF153-Protein, konnte jedoch in Wildtyp-Proteinextrakten kein Signal der erwarteten Größe bei 7 kDa, was dem reifen Protein entspräche oder 15 kDa, was dem unprozessierten HCF153 entspräche, detektieren. Es wurde allerdings ein deutliches Signal bei 33 kDa detektiert. In Lokalisations-Studien des Cytochrom b_6f -Komplexes im linearen Saccharosedichtegradienten stellte sich dann heraus, daß es sich bei diesem unspezifischen Signal des HCF153-Antiserums um Cytochrom f handelt (Henning Plücker, persönliche Mitteilung). Warum das gewonnene Antiserum in Wildtyp-Proteinextrakten kein HCF153-Protein wohl aber Cytochrom f detektiert, konnte bislang nicht aufgeklärt werden. Da also kein geeignetes Antiserum zur Verfügung steht, um HCF153 auf immunologischem Wege zu lokalisieren, soll die Lokalisation des Faktors HCF153 stattdessen nun über *in vitro* Proteinimport-Experimente an Erbse-Chloroplasten im Labor von Prof. Colin Robinson (Universität Warwick, England) vorgenommen werden. Die Ergebnisse dieser Experimente stehen noch aus.

III.3.2 Analyse des Faktors HCF164

III.3.2.1 HCF164 kodiert ein Thioredoxin-ähnliches Protein

Die *HCF164*-cDNA enthält ein offenes Leseraster von 261 Aminosäuren (Abb. 8). Das daraus resultierende Protein HCF164 besitzt ein berechnetes Molekulargewicht von 29 kDa. Die Hydropathie-Analyse ergab eine dreigeteilte Domänenstruktur des Proteins: eine N-terminale hydrophile Region bis zur Aminosäure 97, gefolgt von einer hydrophoben Domäne von Aminosäure 98 bis 113, an die sich eine lange C-terminale hydrophile Region von Aminosäure 114 bis 261 anschließt (Abb. 13). Die ersten beiden Domänen zeigen Merkmale, die für plastidäre Transitsequenzen von luminal lokalisierten Proteinen typisch sind (Robinson und Mant, 1997).

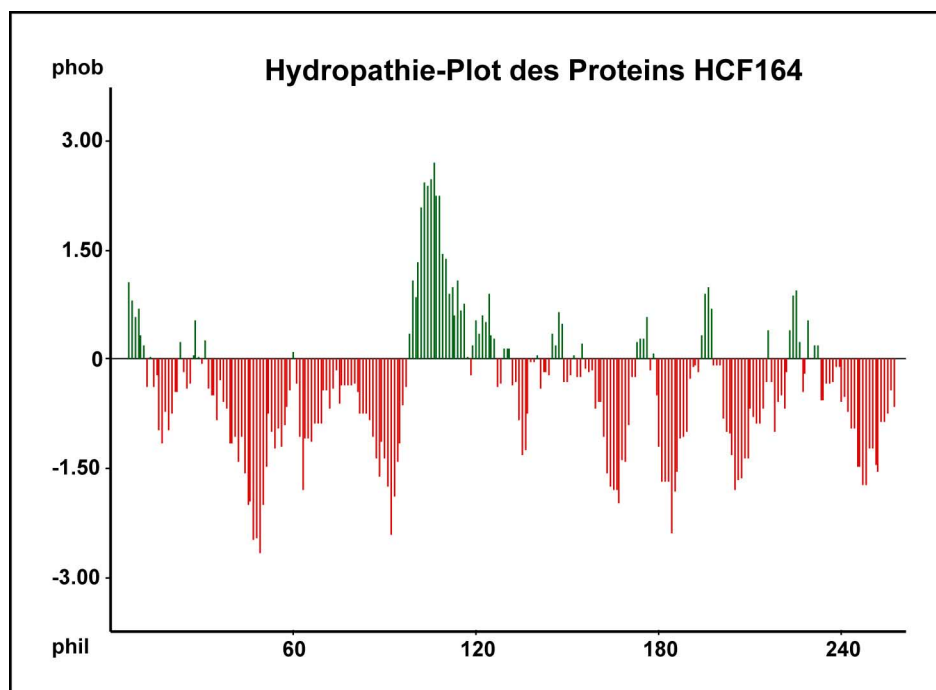


Abb. 13: Hydropathie-Analyse des Proteins HCF164.

Die C-terminale hydrophile Domäne von HCF164 enthält ein WCxxC-Motiv, das charakteristisch für das aktive Zentrum von Thioredoxinen ist (Holmgren, 1989). Dies legte die Vermutung nahe, daß es sich bei HCF164 um ein Thioredoxin-ähnliches Protein handelt. Bestätigt wurde diese Hypothese durch Datenbanksuchen und Proteinsequenzvergleiche. In der Region um das WCxxC-Motiv zeigt HCF164 nämlich signifikante Ähnlichkeiten zu Thioredoxinen, Thioredoxin-ähnlichen Proteinen und Protein-Disulfid-Isomerasen.

Thioredoxine sind lösliche Proteine mit einem Molekulargewicht von 10-12 kDa, die auf Aminosäure-Ebene mindestens 50% Homologie besitzen (Holmgren, 1985). Thioredoxin-ähnliche Proteine sind größer als die klassischen Thioredoxine (ca. 20 kDa) und zeigen mehr Sequenzdiversität. Protein-Disulfid-Isomerasen hingegen sind wesentlich größere Proteine, die zwei Thioredoxin-Motive besitzen (Freedman *et al.*, 1994).

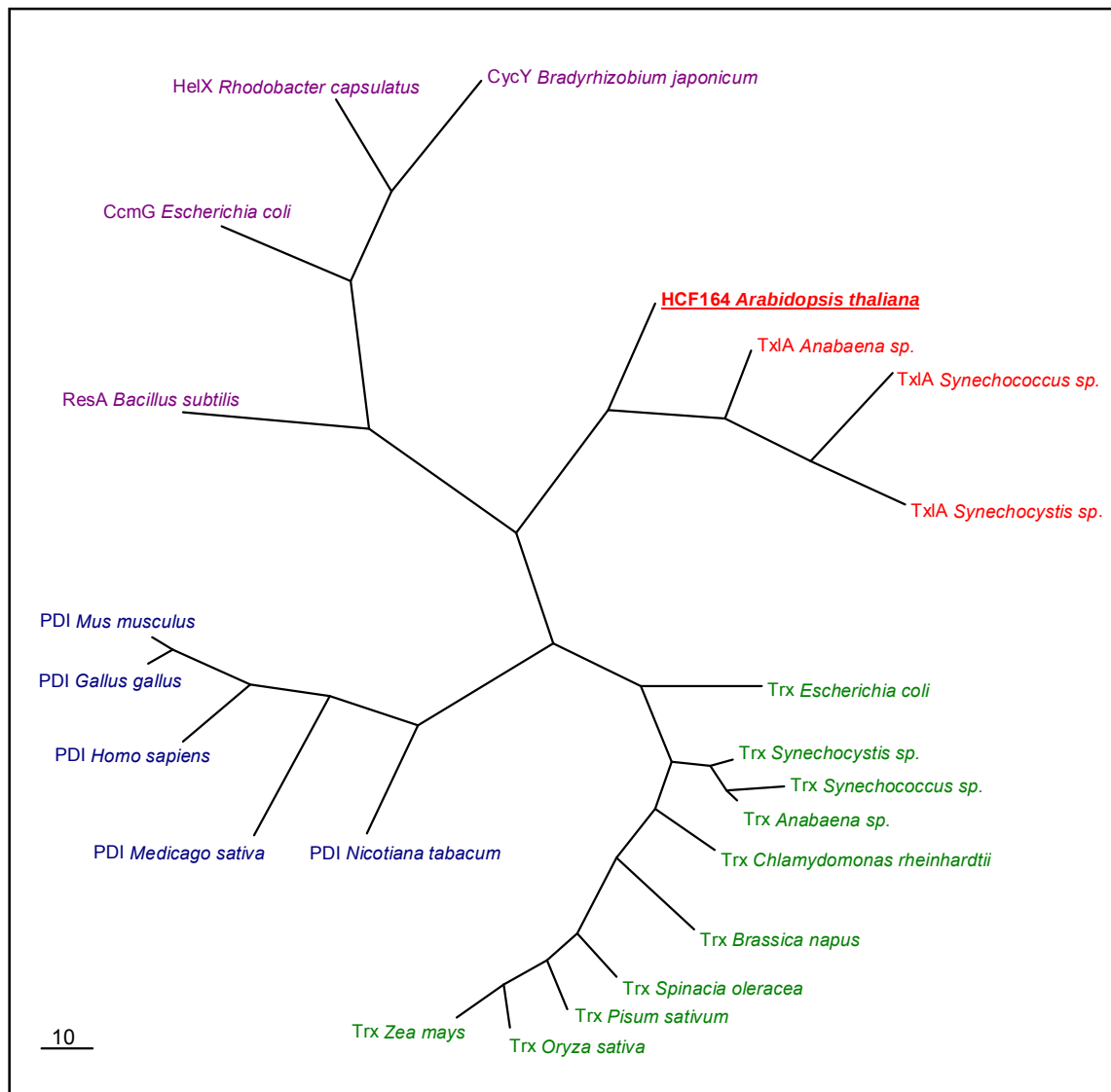


Abb. 14: Phylogenetische Untersuchung von Proteinen mit Thioredoxin-Domänen. Die Aminosäuresequenzen wurden mit dem Programm Clustal X 1.8 miteinander verglichen und dann mit Hilfe des Programms Paup 4.0 ein Ähnlichkeits-Baum erstellt. Es wurden folgende Thioredoxine (Trx), Protein-Disulfid-Isomerasen (PDI) und Thioredoxin-ähnliche Proteine miteinander verglichen: CcmG aus *Escherichia coli* (Acc.-Nr. P33926), CycY aus *Bradyrhizobium japonicum* (Acc.-Nr. P30960), HCF164 aus *Arabidopsis thaliana* (diese Arbeit), HelX aus *Rhodobacter capsulatus* (Acc.-Nr. P36893), ResA aus *Bacillus subtilis* (Acc.-Nr. P35160), TxIA aus *Anabaena sp.* PCC7120 (Cyanobase, Kazusa Research Institute), *Synechococcus sp.* PCC7942 (Acc.-Nr. P35088) und *Synechocystis sp.* PCC6803 (Acc.-Nr. P73920), PDI aus *Gallus gallus* (Acc.-Nr. P09102), *Homo sapiens* (Acc.-Nr. P30101), *Medicago sativa* (Acc.-Nr. P29828), *Mus Musculus* (Acc.-Nr. P09103) und *Nicotiana tabacum* (Acc.-Nr. Y11209), Trx aus *Anabaena sp.* PCC7120 (Acc.-Nr. P06544), *Brassica napus* (Acc.-Nr. AAB52409), *Chlamydomonas reinhardtii* (Acc.-Nr. S10743), *Escherichia coli* (Acc.-Nr. BAA16469), *Oryza sativa* (Acc.-Nr. Q42443), *Pisum sativum* (Acc.-Nr. P48384), *Spinacia oleracea* (Acc.-Nr. P09856), *Synechococcus sp.* PCC6301 (Acc.-Nr. P12243), *Synechocystis sp.* PCC6803 (Acc.-Nr. P52231) und *Zea mays* (Acc.-Nr. Q41864).

Eine Aufarbeitung der gefundenen Sequenzen in einem Ähnlichkeits-Baum ist in Abb. 14 dargestellt und zeigt, daß HCF164 eindeutig in die Gruppe der Thioredoxin-ähnlichen Proteine einzuordnen ist. Die Thioredoxine und die Protein-Disulfid-Isomerasen bilden in diesem Schema jeweils eine eigene Gruppe.

Tx1A	Synechocystis	-----
Tx1A	Anabaena	-----
Tx1A	Synechococcus	-----
HCF164	Arabidopsis	MARLVFSLNLPSSHGFLNSPRNLQSFFVTQTGAPRFAVRCKPNPESSETKQEKLVIDNG
Tx1A	Synechocystis	-----MTADNSVPSRLRNILVIAAALVLTILVVLGSRQPSAAA
Tx1A	Anabaena	-----MSTDSPIKPETTAGERLRNFLVAIVAIALTVALVLGLRTETA
Tx1A	Synechococcus	-----MTPAKIRNALLAVVAIALSAAYVLGFQTQTQGI
HCF164	Arabidopsis	ETSSASKEVESSSSVADSSSSSSSGFPESPNDINRRVAAVTVIAALSFLVSTRLD- FGI
		: * : .: : : : .
Tx1A	Synechocystis	SLASLAEQATPYEVAIANDRPMLLEFYADWCTSCQAMAGRIAALKQDYSDRLDFVMLNID
Tx1A	Anabaena	SLDKLYAASTPLEVAISNGKPSMVEFYANWCTVCQKMAPDIAEFEQQYADKMNFVMLNVD
Tx1A	Synechococcus	SLEAQARAIPLATALDNGRPTLVEFYADWCTSCQAMAPDLAELKKNYGGSVNFAMLNVD
HCF164	Arabidopsis	SLKDLTASALPYEEALSNGKPTVVEFYADWCEVCRELAPDVYKIEQQYKDKVNFVMLNVD
		** : * * : : * : : : : * * : : : * : : : * : : * : : * : : *
Tx1A	Synechocystis	NDKWLPVLDYNVDGIPQFVYLNQGQGPQGISIGELPRSVLAANLDALVEA-QPLPYTNA
Tx1A	Anabaena	NTKWLPVLDYNVDGIPQFVYLNQGQGPQGISIGELPRSVLAANLDALVEA-QPLPYTNA
Tx1A	Synechococcus	NNKWLPVLDYNVDGIPQFVYLNQGQGPQGISIGELPRSVLAANLDALVEA-QPLPYTNA
HCF164	Arabidopsis	NTKWEQELDEFGVEGIPHFALDREGNEEGNVVGRLPQRYLVENVNALAAGQSIPIYARA
		* * * * : : : : * : : * : : * : : * : : * : : *
Tx1A	Synechocystis	RGNLSEFSADLQPSRSSQTDPRSHSGQVQDGVLD
Tx1A	Anabaena	SGQVSQVSTPVAPIGS-QDDPRSHSGQVQVNZ---
Tx1A	Synechococcus	TGQTSVVENRTIEADP--TSPRSHGNRPS----
HCF164	Arabidopsis	VGQYSSSESRRKHVQVT---DPLSHG-----
		* : * * * *
A		
CcmG	E.Coli	-----
HCF164	A.thaliana	MARLVFSLNLPSSHGFLNSPRNLQSFFVTQTGAPRFAVRCKPNPESSETKQEKLVIDNG
CcmG	E.Coli	-----MKRKVLLIPLIIFLAIAAALLWQLARNAEGDDPTNLESALIGKPVKPFRL
HCF164	A.thaliana	ETSSASKEVESSSSVADSSSSSSSGFPESPNDINRRVAAVTVIAALSFLVSTRLDGFGIS
		. * . . . : : : * . . . * : : .
CcmG	E.Coli	ESLDNPGQFYQADVLTQGKPVLLNVWATWCPTCRAEHQYLNQLSAQGIQVVMNYK-DDR
HCF164	A.thaliana	LKDLTASALPYEEALSNGKPTVVEFYADWCEVCRELAPDVYKIEQQYKDKVNFVMLNVDN
		. . . : : * : : * : : * : : * : : * : : *
CcmG	E.Coli	QKAISWLKELGNPYALSFLDGDGMLGLDLG--VYGAPETFLID-NGIIRYRHAGDLNPR
HCF164	A.thaliana	TKWEQELDEFG-VEGIPHFALDREGNEEGNVVGRLPQRYLVENVNALAAGQSIPIYARA
		* . * : * . . . * : * * * : : * : : * : : *
CcmG	E.Coli	VWEEIIPKPLWEKYSKEAAQ---
HCF164	A.thaliana	VGQYSSSESRRKHVQVT---DPLSHG-----
		* : . . . : : .
B		

Abb. 15: Aminosäuresequenzvergleiche mit HCF164. (A) Vergleich der Aminosäuresequenzen von HCF164 mit den Tx1A-Homologen aus *Synechocystis* sp. PCC6803 (Acc.-Nr. P73920), *Synechococcus* sp. PCC7942 (Acc.-Nr. P35088) und *Anabaena* sp. PCC7120 (Cyanobase, Kazusa Research Institute). **(B)** Aminosäuresequenzvergleich von HCF164 und CcmG aus *Escherichia coli* (Acc.-Nr. P33926). Identische Aminosäuren sind durch Sterne markiert und ähnliche Aminosäuren durch Punkte gekennzeichnet. Das Thioredoxin-Motiv ist jeweils durch einen Kasten hervorgehoben und die hydrophobe Region ist schattiert dargestellt.

Die größte Ähnlichkeit zu HCF164 zeigen die Thioredoxin-ähnlichen Proteine TxIA aus *Synechocystis* sp. PCC6803 mit 58% Ähnlichkeit, *Synechococcus* sp. PCC7249 mit 54% Ähnlichkeit und *Anabaena* sp. PCC 7120 mit 64% Ähnlichkeit. Der Aminosäurevergleich aller vier Proteine ist in Abb. 15A dargestellt. Die Funktion dieser Blaualgen-Proteine ist noch nicht bekannt.

Ebenfalls deutliche Ähnlichkeit zu dem HCF164-Protein findet man in einer weiteren Gruppe Thioredoxin-ähnlicher Proteine, die sich aus dem Protein CcmG aus *Escherichia coli* und dessen Homologen aus anderen Bakterien zusammensetzt. So ergibt sich zwischen HCF164 und CcmG eine Ähnlichkeit von 32%. Dieser Sequenzvergleich ist in Abb. 15B wiedergegeben. CcmG ist ein periplasmatisches Protein, welches im *ccmA-H*-Gencluster von *E.coli* kodiert wird. Alle Mitglieder dieses Genclusters sind an der Reifung von c-Typ-Cytochromen im Periplasma von *E.coli* beteiligt (Fabianek *et al.*, 1998). Die Homologie zu CcmG deutet deshalb auf eine mögliche Funktion von HCF164 bei der Reifung von Cytochrom f während der Biogenese des Cytochrom b_6f -Komplexes hin.

III.3.2.2 Rekombinantes HCF164-Protein besitzt Disulfid-Reduktase-Aktivität *in vitro*

Laut Sequenzanalyse handelt es sich bei HCF164 um ein Thioredoxin-ähnliches Protein mit einem Thioredoxin-Motiv von Aminosäure 149-153. Dieses Motiv ist in Abb. 15 durch einen Kasten hervorgehoben. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde untersucht, ob HCF164 Disulfid-Reduktase-Aktivität besitzt. Dazu wurde der Insulin-Reduktions-Test durchgeführt. Derartige Testsysteme werden üblicherweise benutzt, um Proteine auf eine mögliche Thioredoxin-Aktivität zu testen (Holmgren, 1979). Das Testprinzip beruht darauf, daß Thioredoxin in Anwesenheit von Dithiothreitol die beiden intermolekularen Disulfidbrücken zwischen der A- und B-Kette des Insulins reduziert. Daraufhin fällt die nun unlösliche B-Kette aus, was anhand der Absorptionsänderung bei 650 nm verfolgt werden kann.

Für diese Analysen wurde der C-terminale hydrophile Teil von HCF164 von Aminosäure 116 bis 261 mit einem His-Tag fusioniert und anschließend wie unter II.6.12 beschrieben in *E.coli* überexprimiert und mittels Metall-Chelat-Chromatografie aus der periplasmatischen Fraktion aufgereinigt.

Der Insulin-Reduktions-Test wurde nach Holmgren (1979) wie unter II.6.13 beschrieben durchgeführt. In Abb. 16 ist zu sehen, daß das rekombinante HCF164-Protein in Anwesenheit von Dithiothreitol die Reduktion von Insulin deutlich beschleunigt im Vergleich zur Negativkontrolle, bei der nur Dithiothreitol zugesetzt wurde. Dieses Experiment demonstriert, daß rekombinantes HCF164 *in vitro* Disulfid-Reduktase-Aktivität besitzt.

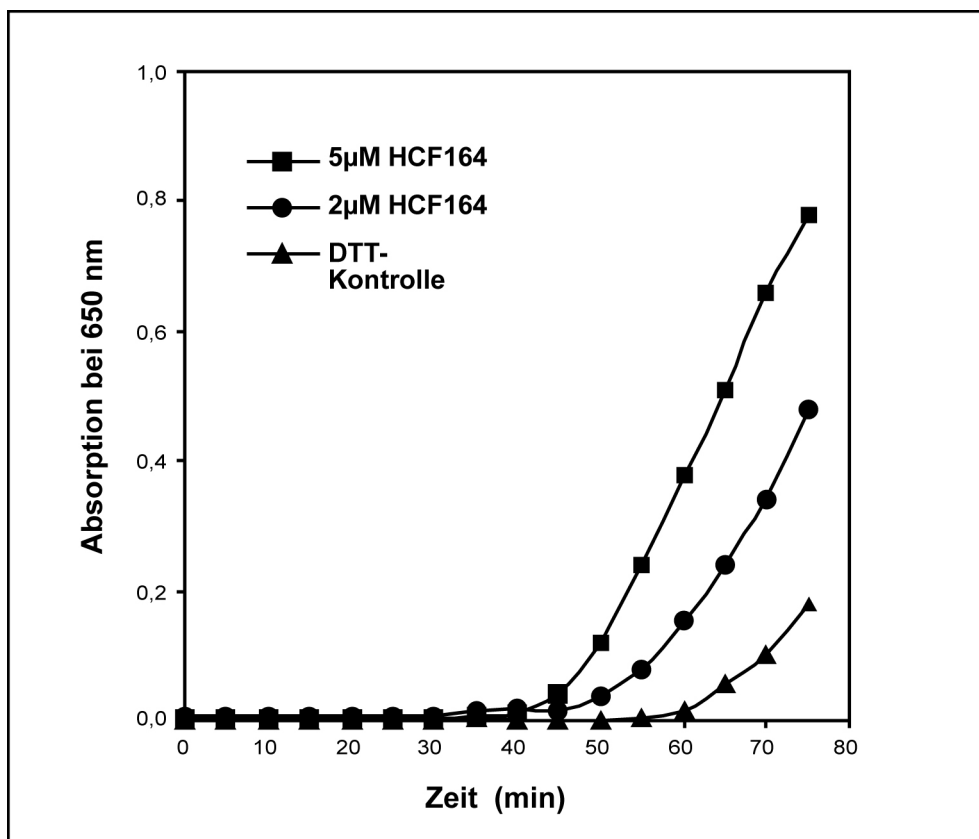


Abb. 16: Messung der Disulfid-Reduktase-Aktivität von rekombinantem HCF164-Protein im Insulin-Reduktions-Trübungs-Test. Das Reaktionsgemisch enthielt 100 mM NaPO₄ pH 7.0, 1 mM EDTA, 1 mg/ml Insulin, 0.35 mM DTT und 2 µM bzw. 5 µM HCF164-Protein. Die nicht-enzymatische Reduktion von Insulin durch DTT diente als Negativkontrolle. Gemessen wurde die Absorptionsänderung bei 650 nm.

III.3.2.3 Suche nach Interaktoren zu HCF164 im Hefe-Zweihybridsystem

Die Suche nach nukleär kodierten Interaktoren für das Protein HCF164 erfolgte analog zu dem bereits für HCF153 beschriebenen Ansatz (s. III.3.1.2). Der gesamte kodierende Bereich der *HCF164*-cDNA wurde in den Vektor pGBT9 kloniert, das Konstrukt durch Sequenzierung überprüft und in den Hefestamm PJ69-4A transformiert. Anschließend wurde folgende Kreuzung durchgeführt: PJ69-4A mit pGBT9-HCF164 x Y187 mit pGAD10-cDNA-Bank.

Es wurden 1.2×10^9 PJ69-4A-Hefezellen mit 1.3×10^8 Y187-Hefezellen gekreuzt und lieferten bei einer Kreuzungsrate von 16% eine Gesamtzahl von 2.1×10^7 diploiden Zellen, womit die verwendete cDNA-Bank (3×10^6 unabhängige Klone) mehrfach abgedeckt war. Der Ansatz wurde je zur Hälfte auf Aktivierung des ADE2- bzw. des HIS3-Reportergens selektiert. Dabei ergaben sich 9 positive Klone, die sich jedoch nach der reziproken Selektion auf die Aktivierung des jeweiligen anderen Reportergens als falsch-positive Klone herausstellten. Somit konnte für HCF164 über die Sichtung einer *Arabidopsis*-cDNA-Bank im Hefe-Zweihybridsystem kein nukleär kodierter Interaktionspartner identifiziert werden.

III.3.2.4 HCF164 ist ein Thylakoidmembranprotein, dessen hydrophiler C-terminaler Teil ins Lumen ragt

Die Analyse der Aminosäuresequenz (Abb. 15) legte nahe, daß es sich bei dem Protein HCF164 um ein plastidäres Protein handelt, welches im Thylakoidlumen lokalisiert ist, da sowohl Charakteristika einer Chloroplasten- als auch einer Lumen-Transitsequenz vorhanden sind. Das Protein beginnt mit dem Motiv MA und besitzt eine serinreiche Region von Aminosäure 62 bis 84, was beides charakteristisch für plastidäre Transitpeptide ist (Robinson und Mant, 1997). Weiterhin deutet die Anwesenheit eines Zwillingsarginins bei den Aminosäuren 96/97 darauf hin, daß das Protein HCF164 mit Hilfe des Δ pH-abhängigen Translokations-Mechanismus über die Thylakoidmembran ins Lumen transportiert wird (Hynds *et al.*, 2000). Mit zum luminalen Transitpeptid gehört dann außerdem die 16 Aminosäuren lange hydrophobe Domäne direkt hinter dem Zwillingsarginin. Werden sowohl die plastidäre als auch die luminal Transitsequenz prozessiert, so erhält man ein reifes Protein von ca. 16 kDa. Wird hingegen nur hinter dem Chloroplasten-Signalpeptid geschnitten, so ist das reife Protein 20 kDa groß.

Um die intrazelluläre Lokalisation von HCF164 zu ermitteln, wurde zunächst ein polyklonales Antiserum gegen rekombinantes HCF164-Protein gewonnen. Dazu wurden die Aminosäuren 85-261 von HCF164 wie unter II.6.11 beschrieben in einem GST-Fusionsprotein in *E.coli* überexprimiert und das rekombinante HCF164 über zweifache präparative SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgereinigt. Das erhaltene affinitätsgereinigte Antiserum kam in den folgenden Immunoblot-Experimenten zum Einsatz. In Blattproteinextrakten aus *Arabidopsis*-Wildtyp-Pflanzen detektierte das Antiserum ein Protein von 26 kDa (Abb. 17A). Demgegenüber wurde in der Mutante *hcf164* kein Protein dieser Größe detektiert. Dies steht in Einklang mit den Ergebnissen der Northern-Analyse (Abb. 10), die gezeigt hatte, daß das *HCF164*-Transkript in der Mutante fehlt.

Das im Wildtyp detektierte Protein ist jedoch nur 3 kDa kleiner als die für das HCF164-Vorläuferprotein berechnete Größe von 29 kDa und es ist größer als die für das reife Protein vorhergesagten Größen von 16 kDa bzw. 20 kDa. Dies legt den Schluß nahe, daß ein großer Teil der Transitsequenz nicht abgespalten wird sondern im reifen Protein verbleibt. Die hydrophobe Domäne des Transitpeptids könnte dann dem reifen Protein als Membrananker dienen. Um diese Vermutung zu bestätigen wurden aus intakten Spinat-Chloroplasten mittels Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation die Hüllmembranen und die Thylakoidmembranen gewonnen (s. II.6.2-3) und diese Fraktionen mittels Immunoblot analysiert. Aus Abb. 17B geht hervor, daß es sich bei HCF164 um ein Chloroplasten-Protein handelt, welches nur in den Thylakoidmembranen aber nicht in den Hüllmembranen detektiert wurde. Um die Verankerung des HCF164-Proteins in der Thylakoidmembran zu zeigen, wurden Spinatthylakoide wie unter II.6.4-5 beschrieben sonifiziert und verschiedenen Salzwaschungen unterzogen. HCF164 konnte weder mit 0.25 M NaCl noch mit 0.2 M Na₂CO₃ noch mit 1 M CaCl₂ von der Membran abgelöst werden im Gegensatz zur

extrinsischen 23 K-Untereinheit des PS II, die als Kontrolle diente (Abb. 17C). Diese Ergebnisse zeigen, daß HCF164 fest in der Thylakoidmembran verankert ist. Dies unterstützt die Hypothese, daß der hydrophobe Teil des Transitpeptids nicht abgespalten wird und dem ansonsten hydrophilen Protein als Membrananker dient.

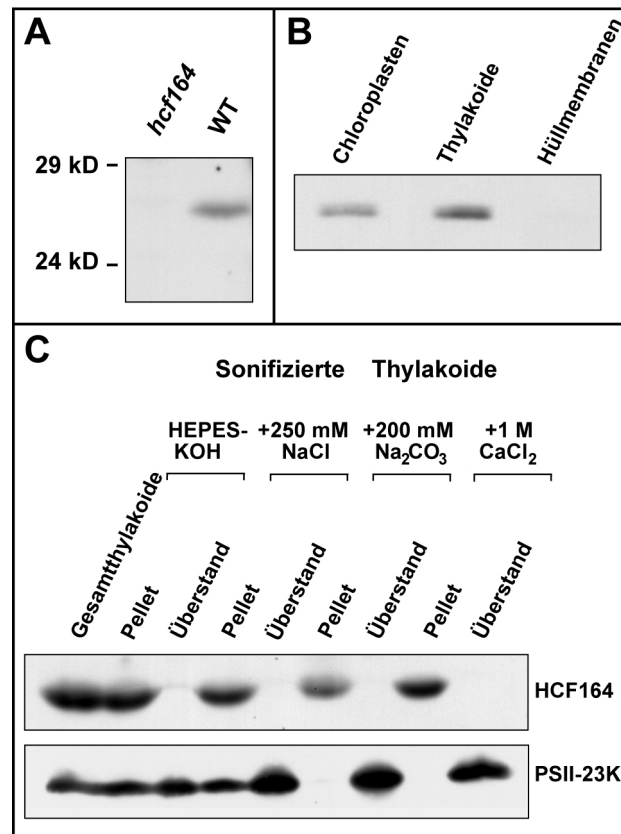


Abb. 17: Immunolokalisation des Proteins HCF164. (A) Immunoblot-Analyse des Proteins HCF164 aus Wildtyp und Mutante. Gesamtmembranproteine wurden aus *Arabidopsis*-Blättern isoliert, über SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt und immunologisch detektiert. Pro Bahn wurde eine Proteinmenge entsprechend 10 µg Chlorophyll aufgetragen. (B) Lokalisation von HCF164 im Chloroplasten. Plastidäre Proteine aus Spinat wurden über einen Saccharose-Stufengradienten wie in Material und Methoden beschrieben fraktioniert. Pro Bahn wurde eine Proteinmenge von 30 µg auf einem SDS-Polyacrylamidgel, welches 6 M Harnstoff enthielt, aufgetrennt und mittels Immunoblot analysiert. (C) Salzwaschungen von Thylakoidmembranen. Spinat-Thylakoide wurden in den angegebenen Salzkonzentrationen sonifiziert und anschließend die Membranproteine über Zentrifugation von den löslichen Proteinen getrennt. Pro Bahn wurde eine Proteinmenge entsprechend 10 µg Chlorophyll wie oben beschrieben analysiert. Das luminale 23 kDa Protein des PS II diente dabei als Marker für ein Membran-assoziiertes, aber ablösbares, hydrophiles Thylakoidmembran-Protein.

Anschließend stellte sich die Frage, ob der lange hydrophile C-terminale Teil des HCF164-Proteins ins Stroma oder ins Thylakoidlumen ragt. Dazu wurden Thermolysin-Behandlungen intakter und sonifizierter Thylakoide wie unter II.6.6 beschrieben vorgenommen (Abb. 18). Wurden intakte Thylakoide mit Thermolysin inkubiert, so blieb HCF164 für mindestens fünf Minuten stabil. Die luminale 23 K-Untereinheit des PS II war genauso geschützt, während die stromale Ferredoxin-NADP-Oxidoreduktase (FNR) innerhalb einer Minute degradiert wurde. Inkubierte man demgegenüber sonifizierte Thylakoide, die zu je ca. 50 % aus right-side-out und inside-out Vesikeln bestanden, mit Thermolysin, so waren sowohl das HCF164-Protein als auch die 23 K-PS II-Untereinheit nicht länger geschützt und wurden folglich sehr schnell innerhalb einer Minute Inkubationszeit degradiert.

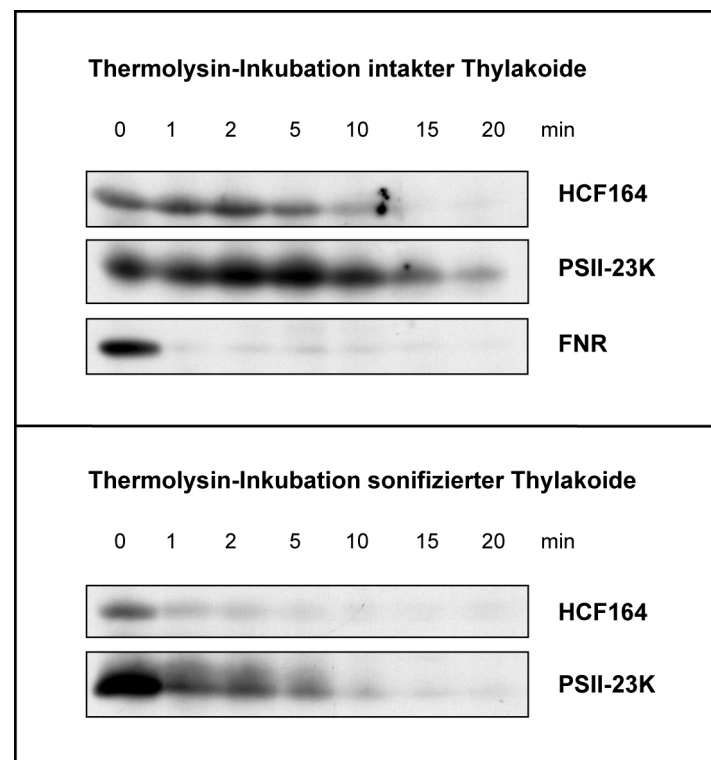


Abb. 18: Luminale Lokalisation des Proteins HCF164. Intakte und sonifizierte Spinat-Thylakoide wurden mit Thermolysin in einer Endkonzentration von 0.1 mg/ml inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die Reaktion durch Zugabe von EDTA in einer Endkonzentration von 50 mM gestoppt. Die Membranen wurden abzentrifugiert und für die anschließende Immunoblot-Analyse pro Bahn eine Proteinmenge entsprechend 10 µg Chlorophyll aufgetragen. Als Kontrolle für ein peripheres Thylakoidmembran-Protein, welches zur stromalen Seite gerichtet ist, wurde die Ferredoxin-NADP-Oxidoreduktase (FNR) benutzt und das 23 kDa Protein des PS II diente als Kontrolle für ein luminales Protein.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß HCF164 über seine N-terminale hydrophobe Domäne in die Thylakoidmembran inseriert ist und daß der C-terminale hydrophile Teil, der auch das Thio-redoxin-Motiv enthält, zum Lumen orientiert ist.

IV. Diskussion

Der Cytochrom b_6f -Komplex setzt sich aus nukleär und plastidär kodierten Untereinheiten zusammen. Daher werden für seine Biogenese eine Reihe von Regel- und Hilfsfaktoren benötigt, die die Genexpression in Kern und Plastide miteinander koordinieren und gewährleisten, daß ein funktioneller Komplex aufgebaut wird. Da es sich bei diesen Faktoren zumeist um Minoritätsfaktoren handelt, ist ihre Identifizierung auf biochemischem Wege nur schwer zugänglich. Demgegenüber stellt die Analyse nukleärer *hcf*-Mutanten mit einem spezifischen Defekt im Cytochrom b_6f -Komplex einen vielversprechenden Ansatz zur Identifizierung derartiger Hilfsfaktoren dar. In den letzten Jahren erfolgte die Charakterisierung einer ganzen Reihe solcher Mutanten sowohl von den höheren Pflanzen *Arabidopsis thaliana* (Dinkins *et al.*, 1994; Meurer *et al.*, 1996), Mais (Barkan *et al.*, 1994; Voelker und Barkan, 1995a; Fisk *et al.*, 1999), und *Lemna perpusilla* (Bruce und Malkin, 1991) als auch von der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* (Howe und Merchant, 1992; Kuras und Wollman, 1994; Gumpel *et al.*, 1995; Howe *et al.*, 1995). Dabei konnte mit Hilfe einer *hcf*-Mutante von Mais das Gen *crp1* isoliert werden, dessen Genprodukt einerseits für die Prozessierung der *petD*-mRNA notwendig ist und andererseits eine Rolle für die Translationsinitiation bei *petA* spielt (Fisk *et al.*, 1999). Eine Mutante von *Chlamydomonas reinhardtii* diente der Isolation des Gens *CCS1*, dessen Genprodukt neben einer ganzen Reihe anderer Faktoren bei der Reifung von Cytochrom *f* beteiligt ist (Inoue *et al.*, 1997). Bei den anderen Mutanten ist das betroffene Gen bislang noch nicht isoliert worden und deshalb steht auch die Charakterisierung des entsprechenden Biogenesefaktors dort noch aus. Im Rahmen dieser Arbeit wurden mit Hilfe der T-DNA-Insertionsmutanten *hcf153* und *hcf164* von *Arabidopsis thaliana* zwei Faktoren isoliert und charakterisiert, die für die Biogenese des Cytochrom b_6f -Komplexes in den Chloroplasten höherer Pflanzen essentiell sind.

IV.1 Die Mutanten *hcf153* und *hcf164* von *Arabidopsis thaliana* sind spezifisch im Cytochrom b_6f -Komplex betroffen

Die beiden Mutanten *hcf153* und *hcf164* von *Arabidopsis thaliana* zeigen einen drastischen Defekt im Cytochrom b_6f -Komplex, wobei in beiden Mutanten alle untersuchten Untereinheiten jeweils in gleich starkem Maße reduziert sind. Dies zeigt an, daß jeweils der Cytochrom b_6f -Komplex als Ganzes reduziert ist. Dieses Phänomen ist schon von einer Reihe anderer Mutanten mit Defekten im Cytochrom b_6f -Komplex bekannt. Dort hat man beobachtet, daß unabhängig davon, wo der Primärdefekt der Mutation anzusiedeln ist, am Ende stets das gesamte Set der Untereinheiten des Cytochrom b_6f -Komplexes reduziert ist. Dies wurde sowohl für Mutanten mit Defekten bei der RNA-Prozessierung (Barkan *et al.*, 1994) oder RNA-Stabilität (Gumpel *et al.*, 1995) einzelner Untereinheiten, als auch bei

Mutanten mit Störungen in der Bindung der c-Hämgruppe (Xie *et al.*, 1998) oder der b-Hämgruppen (Kuras *et al.*, 1997) gezeigt. Die Deletion von *petA*, *petB* oder *petD* im Plastom führte ebenfalls zum Ausfall des gesamten Komplexes (Kuras und Wollman, 1994). D.h. egal welche Untereinheit primär betroffen ist oder ob mehrere Untereinheiten gleichzeitig gestört sind und unabhängig davon, auf welcher Ebene der Genexpression der Defekt lokalisiert ist, so führt dies immer zum Verlust des gesamten Cytochrom b_6f -Komplexes, wie es auch in den Mutanten *hcf153* und *hcf164* beobachtet wurde.

Die Untereinheiten der Photosysteme I und II sind in der Mutante *hcf153* nicht reduziert. Daraus kann man schließen, daß es sich bei dieser Mutante um eine spezifische Mutante des Cytochrom b_6f -Komplexes handelt. Demgegenüber findet man in der Mutante *hcf164* auch eine Reduktion in der Akkumulation der beiden Photosysteme. Diese Reduktion beobachtet man aber nur bei Pflanzen, die unter Normallicht angezogen wurden. Bei Anzucht unter Schwachlichtbedingungen akkumulieren sowohl die PS I-Proteine als auch die PS II-Komponenten in normalen Mengen. Die Reduktion der beiden Photosysteme ist folglich ein Sekundäreffekt des durch die Mutation verursachten Primärdefekts im Cytochrom b_6f -Komplex. Derartige sekundäre Reduktionen sind auch bei anderen Photosynthesemutanten bekannt, wo eine drastische Reduktion im PS II oder Cytochrom b_6f -Komplex ebenfalls die anderen Komplexe in Mitleidenschaft zieht (Meurer *et al.*, 1996). So zeigt z.B. die Mutante *hcf136* von *Arabidopsis thaliana* eine drastische Reduktion der PS II-Untereinheiten (Meurer *et al.*, 1998). Bei Anzucht unter Normallicht findet man auch eine starke Reduktion des PS I, die bei Anzucht unter Schwachlichtbedingungen wesentlich abgeschwächt ist (Henning Plücken, pers. Mitteilung). An Mutanten von Mais mit Defekten im Cytochrom b_6f -Komplex wurde gezeigt, daß die bei unter Normallicht angezogenen Mutanten beobachtete Reduktion im PS II bei unter Schwachlicht angezogenen Pflanzen nicht vorhanden war. Folglich wurde diese Reduktion ebenfalls als Sekundäreffekt eingeordnet (Voelker und Barkan, 1995a). Der Mechanismus durch den der Verlust eines dieser Photosynthese-Komplexe zum lichtabhängigen Verlust der anderen führt, ist bislang noch nicht bekannt.

Die Ergebnisse der Proteinspiegelanalyse stehen im Einklang mit den durchgeführten spektroskopischen Analysen der beiden Mutanten. Die Chlorophyll-Fluoreszenz-Induktionskurven zeigen, daß in beiden Mutanten das Verhältnis von variabler Fluoreszenz F_v zur maximalen Fluoreszenz F_m gegenüber dem Wildtyp unverändert ist. Somit kann eine Funktionsstörung im PS II ausgeschlossen werden. Unter aktinischem Licht erfolgt jedoch in der Mutante *hcf153* eine sehr verlangsamte und auch sehr unvollständige und in der Mutante *hcf164* so gut wie gar keine Fluoreszenzabnahme. Dies zeigt an, daß es in den Mutanten zu einem Rückstau von Elektronen kommt. Da die Absorptionskinetiken des P700 in beiden Mutanten deutlich machen, daß das Photosystem I jeweils voll funktionsfähig ist, muß der Elektronenrückstau folglich auf einen Defekt im intersystemischen Elektronentransport zurückzuführen sein.

Die Mutanten *hcf153* und *hcf164* stellen also spezifische Mutanten des Cytochrom b_6f -Komplexes dar, wobei bei *hcf164* Sekundäreffekte auf die Akkumulation aber nicht auf die Funktionalität von PS I und PS II vorhanden sind. Diese sekundären Defekte in den Photosystemen I und II werden bei der Mutante *hcf153* nicht beobachtet, was damit erklärbar ist, daß der Defekt im Cytochrom b_6f -Komplex in dieser Mutante schwächer ist als bei *hcf164* und deshalb nicht zur Ausprägung von Sekundäreffekten führt.

In Northern-Analysen wurde ermittelt, daß weder die Spiegel noch die Größen der getesteten Transkripte der Untereinheiten des Cytochrom b_6f -Komplexes in den Mutanten *hcf153* und *hcf164* gegenüber dem Wildtyp verändert sind. Dies zeigt, daß sich der Defekt in der Biogenese des Cytochrom b_6f -Komplexes in beiden Fällen nicht auf der RNA-Ebene der Genexpression manifestiert, sondern in späteren Schritten der Genexpressionskette anzusiedeln ist. Um Aufschluß über die Ebene der Translation zu erhalten wurden *in-vivo*-Proteinmarkierungsexperimente der plastidären Proteine durchgeführt. Bezüglich des erhaltenen Proteinmusters zeigen sich keine Unterschiede zwischen dem Wildtyp und den beiden Mutanten, während die Gesamtrate der plastidären Proteinsynthese bei der Mutante *hcf164* leicht reduziert ist.

Immunopräzipitationsexperimente mit den plastidären großen Untereinheiten des Cytochrom b_6f -Komplexes konnten zeigen, daß die Synthese von Cytochrom f und PetD in den Mutanten nur schwach reduziert ist und deshalb nicht der Grund für die drastische Reduktion in der Akkumulation der Untereinheiten sein kann.

Die Synthese der Untereinheit Cytochrom f bedarf jedoch noch einer näheren Betrachtung. Bei *Chlamydomonas reinhardtii* wurde nämlich gefunden, daß die Akkumulation von Cytochrom f mittels eines CES-Mechanismus (controlled by epistatic synthesis) durch die Autoregulation der Cytochrom f-Translation reguliert wird. Dazu wird die freie C-terminale Domäne des Proteins benötigt, die aber nicht länger zugänglich ist, sobald das Protein in den Cytochrom b_6f -Komplex eingebaut wurde. Häuft sich reifes, aber nicht eingebautes Cytochrom f an, weil die Untereinheiten Cytochrom b_6 oder PetD nicht gebildet werden und deshalb eine Assemblierung des Cytochrom b_6f -Komplexes nicht stattfindet, so wird die Translation von Cytochrom f gehemmt (Kuras und Wollman, 1994).

Es ergeben sich drei verschiedene Erklärungsansätze, weshalb die Translation von Cytochrom f in den beiden Mutanten *hcf153* und *hcf164* nicht herunterreguliert wird. Erstens besteht die Möglichkeit, daß eine derartige Eigenhemmung der Cytochrom f-Translation durch angehäuften, nicht eingebautes Cytochrom f von der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* nicht auf die höhere Pflanze *Arabidopsis thaliana* übertragbar ist und diese Art der Kontrolle hier nicht stattfindet. Auch in Mais deuten Untersuchungen an einer Mutante des Cytochrom b_6f -Komplexes eher auf eine andere Art der Kontrolle hin. Dort ist der nukleär kodierte Biogenesefaktor CRP1 einerseits für die Prozessierung der *petD*-Vorläufer-mRNA aber zusätzlich auch für die Translation der *petA*-mRNA essentiell (Barkan *et al.*, 1994; Fisk *et al.*, 1999). Eine endgültige Aussage, ob ein CES-Mechanismus bei der Cytochrom f-

Translation in höheren Pflanzen eine Rolle spielt ist derzeit jedoch nicht möglich. Eine zweite Erklärung für die normale Translation von Cytochrom f wäre, daß sich in den Mutanten kein freies Cytochrom f anhäuft, sondern das neu synthetisierte Protein zumindest noch in einen rudimentären Cytochrom b_6f -Komplex eingebaut wird, der dann aber zerfällt oder abgebaut wird, weil durch die Mutation Fehler in der weiteren Assemblierung des Komplexes auftreten. Ein dritter Erklärungsansatz wäre, daß die Reifung von Cytochrom f in den Mutanten gestört ist. Bei Mutanten von *Chlamydomonas* wurde nämlich gezeigt, daß Cytochrom f, welches entweder seinen C-terminalen Anker nicht besitzt oder bei dem der Einbau der Häm-Gruppe nicht erfolgte, nicht länger für eine Hemmung der Cytochrom f-Translation sorgt (Choquet *et al.*, 1998).

Ein Verlust des Cytochrom b_6f -Komplexes könnte auch durch einen Defekt in der Häm-Biosynthese hervorgerufen werden, da dann die Reifung der essentiellen Untereinheiten Cytochrom b_6 und Cytochrom f nicht erfolgen würde. Da aber die Untereinheit Cytochrom b_{559} des Photosystems II bei *hcf153* und unter Schwachlichtbedingungen auch bei *hcf164* in normalen Mengen akkumuliert, kann ein Defekt in der Synthese des Häms ausgeschlossen werden.

Zusammenfassend läßt sich festhalten, daß bei den Mutanten *hcf153* und *hcf164* der Defekt in der Biogenese des Cytochrom b_6f -Komplexes auf posttranslationaler Ebene anzusiedeln ist und sich bei der Protein-Reifung und/oder Stabilität einer der Untereinheiten oder der Assemblierung des funktionsfähigen Komplexes auswirkt.

IV.2 Welche Rolle spielt HCF153 bei der Biogenese des Cytochrom b_6f -Komplexes?

Segregations- und Southern-Analysen der Mutante *hcf153* konnten eine enge Kopplung der Mutation mit der T-DNA-Insertion aufzeigen. Daher konnten Bereiche des betroffenen Gens über inverse PCR ausgehend von der linken T-DNA-Grenzsequenz isoliert werden. Anschließend wurde über die Sichtung einer cDNA-Bank von *Arabidopsis thaliana* der korrespondierende cDNA-Klon isoliert, der aber am 5'-Ende unvollständig war und deshalb mittels 5'-RACE vervollständigt wurde. Der daraus erhaltene cDNA-Klon pcAt-HCF153 entspricht mit einer Länge von 623 Basen der Größe der entsprechenden mRNA des Wildtyps, die in Northern-Analysen mit ca. 0.7 kb ermittelt wurde. Aus den Sequenzvergleichen des Gens *HCF153* mit der korrespondierenden cDNA kann man ablesen, daß die T-DNA-Insertion im 3'-Bereich des Gens erfolgte und zwar befindet sie sich 94 Basen vor dem 3'-Ende der cDNA. In der Mutante kommt es durch die Insertion der T-DNA bei der Transkription zur Bildung eines Fusions-Transkripts mit einer Größe von 2.5 kb. Die gebildete mRNA beginnt mit dem 5'-Bereich des Gens *HCF153*. Daran schließt sich dann die Sequenz des β -Glucoronidase-Reportergens aus dem Bereich der rechten T-DNA-Grenze

an. Dabei ist auf dem Teil der RNA, der vom Gen *HCF153* stammt das komplette Leseraster enthalten, erst dahinter beginnt der Teil, der von der T-DNA stammt. Die Expression von *HCF153* wird demnach wahrscheinlich durch die Bildung von Sekundärstrukturen innerhalb dieser Fusions-mRNA und durch daraus resultierende Probleme bei der Translation des Faktors behindert. Mit der erfolgreichen Komplementation der Mutante durch die isolierte cDNA konnte demonstriert werden, daß die T-DNA-Insertion in das Gen *HCF153* und somit der Ausfall des Faktors *HCF153* und nicht etwa der Einfluß der T-DNA auf ein weiteres benachbartes Gen für den beobachteten *hcf*-Phänotyp verantwortlich ist. Außerdem geht aus diesem Ergebnis hervor, daß die isolierte cDNA ein funktionelles *HCF153*-Protein kodiert.

Aus der cDNA läßt sich eine Aminosäuresequenz von 137 Aminosäuren ableiten, die ein Protein mit einer Größe von ca. 15 kDa ergibt. In der N-terminalen Region bis zu Aminosäure 60 findet man Merkmale, die für plastidäre Transitsequenzen charakteristisch sind (Robinson und Mant, 1997): Das Protein beginnt mit den Aminosäuren MA, des weiteren findet man dort einen Abschnitt mit unpolaren Aminosäuren und schließlich noch einen serinreichen Abschnitt. Das Zwillingsarginin bei Aminosäure 45/46 und der kurz darauf folgende Abschnitt mit basischen Aminosäuren geben zusätzlich einen Hinweis für eine mögliche Transloaktion des Proteins ins Lumen über den Δ pH-Weg (Robinson und Mant, 1997; Hynds *et al.*, 2000).

Zu *HCF153* wurden in Datenbanksuchen auf der Ebene der Aminosäuren und auch auf der Nukleotid-Ebene keine Sequenzähnlichkeiten gefunden, die Rückschlüsse auf eine mögliche Funktion des Faktors zugelassen hätten. Auch zu cyanobakteriellen Genen wurden keinerlei Ähnlichkeiten gefunden. Möglicherweise handelt es sich dennoch um ein Gen cyanobakteriellen Ursprungs, bei dem sich die Sequenz im Laufe der Evolution so stark verändert hat, daß eine Ähnlichkeit nicht mehr ohne weiteres erkennbar ist. Mit größerer Wahrscheinlichkeit handelt es sich jedoch um einen neuerworbenen Faktor des Chloroplasten-Proteoms, der für die Biogenese des Cytochrom b_6f -Komplexes in höheren Pflanzen essentiell ist. Die Ursache hierfür liegt eventuell darin begründet, daß das genetische Material des Cytochrom b_6f -Komplexes nun auf zwei verschiedene Kompartimente verteilt ist und somit für die koordinierte Biogenese des Komplexes der Faktor *HCF153* zusätzlich zu den bereits in Cyanobakterien vorhandenen Hilfsfaktoren notwendig geworden ist.

Die Daten zur Charakterisierung der Mutante *hcf153* lassen für die Vorhersage der Funktion des Faktors *HCF153* momentan verschiedene Möglichkeiten zu. In den *in vivo*-Proteinmarkierungsexperimenten zeigten sowohl die Spiegel und Muster der Gesamtmarkierungsextrakte als auch die Immunopräzipitation der Untereinheiten Cytochrom *f* und *PetD*, daß die Translation dieser Untereinheiten nicht durch die Mutation betroffen ist. Eine Rolle von *HCF153* bei der Translation von Cytochrom b_6 kann jedoch momentan nicht ausgeschlossen werden, da die Immunopräzipitationsexperimente mit den zur Verfügung

stehenden Antiseren gegen Cytochrom b_6 nicht erfolgreich waren. Der Gesamt-Markierungsextrakt von *hcf153* zeigt zwar keinen Unterschied zum Wildtyp, aber hier ist das Cytochrom b_6 -Signal aufgrund von Überlagerungen mit höherabundanten Proteinen nicht eindeutig auswertbar. Demgegenüber kann man eine Rolle des Faktors HCF153 bei der Translation des nukleär kodierten Rieske-FeS-Proteins ausschließen, da dieser Schritt im Cytoplasma abläuft, HCF153 aber aller Vorhersage nach im Chloroplasten lokalisiert ist.

Auf posttranslationaler Ebene könnte HCF153 an der Reifung von Untereinheiten des Cytochrom b_6f -Komplexes beteiligt sein, die den Einbau eines Co-Faktors benötigen. An Mutanten von *Chlamydomonas reinhardtii* wurde gezeigt, daß für den Prozess der Häm-Anbindung bei Cytochrom b_6 mindestens die vier nukleär kodierten Faktoren CCB1-4 gebraucht werden (Kuras *et al.*, 1997). Da bislang keiner dieser vier Faktoren isoliert wurde, ist es denkbar, daß HCF153 das Homolog aus höheren Pflanzen zu einem dieser Faktoren repräsentiert.

Ebenso werden für die Biogenese von Cytochrom f eine Reihe von Hilfsfaktoren benötigt. Bei *Chlamydomonas reinhardtii* wurde durch die Analyse von Mutanten ermittelt, daß mindestens die vier nukleär kodierten Faktoren CCS1-4 und der plastidär kodierte Faktor CcsA für die Reifung dieses c-Typ-Cytochroms erforderlich sind (Xie und Merchant, 1996; Xie *et al.*, 1998). Da die nukleären Faktoren CCS2-4 noch nicht isoliert wurden, eröffnet sich auch hier die Möglichkeit einer Mitarbeit von HCF153 als Homolog eines dieser drei Faktoren in *Arabidopsis thaliana*.

Des weiteren ist für das HCF153-Protein auch eine Aufgabe bei der Biogenese des Rieske-FeS-Proteins denkbar. Über die Reifung dieser Untereinheit ist derzeit noch wenig bekannt. Es erscheint wahrscheinlich, daß vor dem Transport des Proteins über den ΔpH -Weg in das Thylakoidlumen bereits im Stroma der Einbau des Eisen-Schwefel-Zentrums erfolgt (vergl. Wollman *et al.*, 1999), wobei wahrscheinlich Hilfsfaktoren zum Einsatz kommen.

Die Assemblierung der verschiedenen Untereinheiten zu einem stabilen und funktionsfähigen Komplex in der Thylakoidmembran erfordert vermutlich ebenfalls die Mitarbeit einer Reihe von Hilfsfaktoren. An Mutanten von Mais konnte zwar bereits gezeigt werden, daß mehrere Faktoren, die auf der posttranslationalen Ebene agieren, wahrscheinlich für die Komplex-Assemblierung gebraucht werden (Voelker und Barkan, 1995a), aber ein genauerer Einblick in deren Wirkmechanismus steht derzeit noch aus.

Die aufgezeigten Funktionsmöglichkeiten für HCF153 bei der Biogenese des Cytochrom b_6f -Komplexes legen nahe, daß das Protein eventuell mit anderen Hilfsfaktoren zusammenarbeitet. Eine Möglichkeit, solche interagierenden Faktoren zu einem bekannten Protein zu ermitteln bietet das Hefe-Zweihybridsystem. Um die Funktion von HCF153 mittels Identifizierung eines Interaktors weiter eingrenzen zu können, wurde das Protein als Köder bei der Sichtung einer *Arabidopsis*-cDNA-Bank im Zweihybridsystem der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* eingesetzt. Dabei konnten jedoch keine positiven Klone gewonnen werden. Es sind verschiedene Gründe denkbar, warum für HCF153 mit diesem

Verfahren kein Interaktor identifiziert wurde. Erstens ist es möglich, daß HCF153 als Köder generell für ein Hefe-Zweihybridsystem nicht geeignet ist, da eine spezifische Faltung des Proteins, die für seine Interaktion notwendig ist, in der Hefezelle nicht eingenommen wird. Zweitens ist denkbar, daß die Interaktion in der Hefezelle deshalb nicht stattfindet, weil eine notwendige Modifizierung des gesuchten interagierenden Proteins nicht vorgenommen wird, oder es ist eventuell sogar noch die gleichzeitige Anwesenheit eines dritten Proteins für eine positive Interaktion erforderlich. Drittens kann es sein, daß die eingesetzte *Arabidopsis*-cDNA-Bank nicht repräsentativ genug war. Durch die Amplifizierung dieser Bank im Vorfeld sind eventuell sehr niedrig abundante regulatorische Proteine verloren gegangen oder nicht mehr in genügender Kopienzahl vorhanden und wurden deshalb nicht identifiziert. Viertens besteht auch noch die Möglichkeit, daß HCF153 gar nicht mit anderen nukleär kodierten regulatorischen Proteinen interagiert, sondern direkt mit denjenigen Untereinheiten des Cytochrom b_6f -Komplexes, die vom Plastom kodiert werden und deren Sequenzen folglich in der benutzten cDNA-Bank nicht vorhanden sind.

Neben weiteren Interaktorsuchen auf biochemischem Wege könnte eine Eingrenzung der möglichen Aufgaben von HCF153 aber auch durch die Ermittlung des Wirkortes dieses Faktors über seine intrazelluläre Lokalisation erfolgen. Zur Zeit werden diese Untersuchungen mittels Importstudien an Erbse-Chloroplasten im Labor von Prof. Colin Robinson (Universität Warwick, England) durchgeführt. Sobald diese Ergebnisse zur Verfügung stehen, kann HCF153 einem bestimmten Kompartiment zugeordnet werden, was die weitere Aufklärung der Funktion des Faktors HCF153 bei der Biogenese des Cytochrom b_6f -Komplexes vereinfachen kann.

IV.3 Die Rolle von HCF164 bei der Reifung von Cytochrom f

Da in der Mutante *hcf164* die T-DNA-Insertion mit der Mutation gekoppelt war, wurde über inverse PCR der angrenzende genomische Bereich isoliert. Anschließend wurde mittels reverser Transkriptions-PCR die korrespondierende cDNA des Gens *HCF164* gewonnen, die 814 Basen lang ist und ein offenes Leseraster von 783 Basen enthält. Die T-DNA ist 34 Basen vor dem ATG-Startkodon in das Gen inseriert. Dies bedeutet, daß sie sich entweder im Promotorbereich oder im 5'-untranslatierten Bereich des Gens *HCF164* befindet. Unabhängig davon, welche dieser beiden Möglichkeiten zutrifft, verhindert die T-DNA-Insertion in jedem Fall die Akkumulation des *HCF164*-Transkriptes. Denn während das Transkript mittels Northern-Analyse mit der cDNA als Sonde im Wildtyp nachgewiesen wurde, fehlt es in der Mutante gänzlich. Die Komplementation der Mutante *hcf164* durch die isolierte cDNA konnte demonstrieren, daß das Fehlen des *HCF164*-Transkripts zu der drastischen Reduktion des Cytochrom b_6f -Komplexes führt und HCF164 folglich essentiell für den korrekten Aufbau dieses Komplexes ist.

Die aus der cDNA abgeleitete Aminosäuresequenz ergibt ein Protein von 261 Aminosäuren mit einem berechneten Molekulargewicht von 29 kDa. Immunlokalisations-Experimente mit intakten und fraktionierten Chloroplasten konnten demonstrieren, daß das HCF164-Protein im Chloroplasten lokalisiert ist und dort in den Thylakoiden nicht aber in der Hüllmembran nachweisbar ist. Weitere Immunlokalisations-Studien zeigten, daß das Protein fest in der Thylakoidmembran verankert ist, wobei seine hydrophile C-terminale Hälfte ins Lumen ragt. Diese Resultate stehen im Einklang mit den gefundenen Sequenzcharakteristiken der N-terminalen Domäne von HCF164. Diese weist nämlich typische Kennzeichen für eine zweigeteilte Plastidentransitsequenz auf, die für den Transport in den Chloroplasten und die anschließende Translokation ins Thylakoidlumen sorgt (Robinson und Mant, 1997). Dabei sind einerseits der Start des Proteins mit dem Motiv MA sowie die serinreiche Region von Aminosäure 62 bis 84 als Merkmale der Chloroplasten-Transitsequenz und andererseits das Zwillingsarginin bei Aminosäure 96/97, auf welches eine hydrophobe Domäne von 16 Aminosäuren folgt, als Charakteristika für ein Lumen-Transitpeptid zu nennen. Allerdings ergibt sich im Westernblot für das reife HCF164-Protein ein apparentes Molekulargewicht von 26 kDa. Dies ist zwar weniger als das mit 29 kDa vorhergesagte Molekulargewicht des HCF164-Vorläuferproteins, aber wesentlich mehr als das mit 16 kDa vorherberechnete Molekulargewicht des reifen Proteins, das entstünde, wenn die Prozessierung des Transitpeptids hinter der Lumen-Transitsequenz stattfinden würde. Die tatsächliche Größe von HCF164 läßt vermuten, daß ein Großteil des Signalpeptids einschließlich der hydrophoben Region der Lumen-Transitdomäne nicht abgeschnitten wird, sondern vielmehr als Teil des reifen Proteins erhalten bleibt. In der Tat konnte auch in der Transitsequenz keine mögliche Schnittstelle für die luminale Prozessierungs-Protease vorhergesagt werden. Somit würde auch der hydrophobe Teil des Signalpeptids im reifen Protein vorhanden sein und könnte als Membrananker dienen, welcher den C-terminalen hydrophilen Teil von HCF164 auf der luminalen Seite an der Thylakoidmembran fixiert. Diese Annahme wird durch die experimentellen Daten bestätigt. Die Salzwasschungen sonifizierter Thylakoide zeigen nämlich, daß das Protein HCF164 weder mit hohen Salzkonzentrationen noch durch alkalische Behandlung von der Membran abgelöst werden konnte. Durch die Inkubation von intakten und sonifizierten Thylakoiden mit Thermolysin wurde außerdem demonstriert, daß das Protein einem proteolytischen Abbau von der stromalen Seite her fast gar nicht und von der luminalen Seite her sehr gut zugänglich ist.

Bei HCF164 handelt es sich um ein Thioredoxin-ähnliches Protein. Dies konnte aufgrund der starken Sequenzhomologie des Proteins mit den Thioredoxin-ähnlichen Proteinen TxlA aus *Synechocystis* sp., *Synechococcus* sp. und *Anabaena* sp. abgeleitet werden. Eine Zerstörung des Faktors TxlA durch Einfügen einer Resistenz-Kassette in der Nähe der Thioredoxin-Domäne, die im Rahmen von Mutagenesestudien in *Synechococcus* sp. vorgenommen wurde, führte dazu, daß die Zellen nicht mehr in der Lage waren photoautotroph zu wachsen (Collier und Grossman, 1995). Leider konnte aber mit diesen

Experimenten die Funktion von TxlA nicht ermittelt werden, da die ausgesegregierten Zellen aufgrund ihres drastischen Phänotyps so schlecht wuchsen, daß ausführliche biochemische Analysen nicht durchgeführt worden sind.

Interessanterweise zeigt das Protein HCF164 auch Ähnlichkeit zu dem Thioredoxin-ähnlichen Protein CcmG aus *E.coli* und dessen Homologen aus anderen gram-negativen Bakterien, nämlich HelX aus *Rhodobacter capsulatus*, CycY aus *Bradyrhizobium japonicum* und *Rhizobium leguminosarum* sowie CcmG aus *Paracoccus denitrificans*. Diese CcmG-Proteine sind in Genclustern kodiert. Die Mitglieder dieser Gencluster sind jeweils allesamt für die Reifung der periplasmatischen c-Typ-Cytochrome essentiell. Nach dem für gram-negative Bakterien entwickelten Modell der c-Typ-Cytochrom-Reifung im Periplasma, reduziert CcmG die SH-Gruppen der beiden Cysteine des Häm-Bindemotivs CxxCH von Apocytochrom c. Diese Funktion von CcmG wurde durch zahlreiche Untersuchungen an den verschiedenen CcmG-Homologen in den unterschiedlichen gram-negativen Bakterien-Spezies ermittelt (Beckman und Kranz, 1993; Vargas *et al.*, 1994; Page und Ferguson, 1997; Fabianek *et al.*, 1997, 1998; Kranz *et al.*, 1998; Page *et al.*, 1998). Die Reduktion von Apocytochrom c ist notwendig, damit die Häm-Gruppe kovalent an das Protein angebunden werden kann, was durch die Faktoren CcmF und CcmH bewerkstelligt werden soll. Im Vorfeld dieser Reaktionen sind aber noch eine ganze Reihe anderer Schritte notwendig. Zunächst einmal muß die Häm-Gruppe vom Cytosol ins Periplasma gelangen. Dies geschieht durch einen wahrscheinlich ATP-abhängigen Transporter, der von den Faktoren CcmA, CcmB und CcmC gebildet wird. Des weiteren muß Präapocytochrom c aus dem Cytosol über den Sec-abhängigen Translokations-Mechanismus ins Periplasma gelangen. Dabei liegen die beiden Cysteine des Häm-Bindemotivs zunächst noch reduziert vor. Um aber vor den im Periplasma vorherrschenden oxidierenden Bedingungen geschützt zu sein, werden sie durch das Hilfsprotein DsbA zunächst zu einer Disulfidbrücke kontrolliert oxidiert. Unmittelbar vor dem Häm-Einbau erfolgt dann die Reduktion der Cysteine durch CcmG. Dieses wiederum bezieht die dafür benötigten Reduktionsäquivalente von dem die Cytoplasmamembran durchspannenden Faktor DipZ, der seinerseits auf der cytoplasmatischen Seite wahrscheinlich durch Thioredoxin reduziert wird. Dieses Modell der komplexen c-Typ-Cytochrom-Biogenese in gram-negativen Bakterien beruht auf einer großen Zahl von Einzeldaten bezüglich der beteiligten Faktoren und wurde ausführlich u.a. von Page *et al.* (1998) und Kranz *et al.* (1998) zusammengefaßt und diskutiert.

Die gefundene Ähnlichkeit zwischen HCF164 und CcmG legt nun die Vermutung nahe, daß HCF164 in analoger Weise wie CcmG arbeitet, indem es Apocytochrom f im Lumen reduziert und damit die Voraussetzung für den anschließend zu erfolgenden Einbau der Häm-Gruppe schafft. Dies wird durch drei Anhaltspunkte unterstützt: Erstens führt die Inaktivierung von HCF164 durch die Insertion einer T-DNA bei *Arabidopsis thaliana* zum Verlust des Cytochrom b_6f -Komplexes. Dies ist zu erwarten, wenn der Biogenesefaktor HCF164 an der Reifung eines c-Typ-Cytochroms, in diesem Fall handelt es sich dabei um Cytochrom f, beteiligt ist. Zweitens konnte durch den Insulin-Reduktionstest gezeigt werden, daß

rekombinantes HCF164 Thiol-Disulfid-Reduktase-Aktivität besitzt. Dies ist auch die für CcmG-Proteine ermittelte enzymatische Aktivität (Monika *et al.*, 1997; Fabianek *et al.*, 1997). Drittens besitzen HCF164 und CcmG innerhalb ihrer jeweiligen Membran eine ähnliche Topologie. Beides sind in der Hauptsache hydrophile Proteine, wobei HCF164 ins Lumen ragt und CcmG im Periplasma lokalisiert ist. Beide werden außerdem mit Hilfe der hydrophoben Domäne ihres nicht abgeschnittenen Transitpeptids in der Thylakoid- bzw. Cytoplasmamembran verankert. Dies ist für CcmG von *E.coli* (Fabianek *et al.*, 1998), *Rhodobacter capsulatus* (Monika *et al.*, 1997) und *Bradyrhizobium japonicum* (Fabianek *et al.*, 1997) ermittelt worden.

Wenn HCF164 bei der Reifung von Cytochrom f als CcmG-Analog auftritt, so ist zu erwarten, daß man im Chloroplasten auch noch andere Analoga der bakteriellen c-Typ-Cytochrom-Reifungsmaschinerie wiederfindet. Diese Annahme wird durch Untersuchungen an Mutanten von *Chlamydomonas reinhardtii* unterstützt. Dabei hat man gefunden, daß mindestens vier nukleär kodierte Faktoren (CCS1-4) und ein plastidär kodierter Faktor (CcsA) für die Reifung der plastidären Cytochrome f und c_6 essentiell sind. Für die Reifung des plastidären Cytochrom b_{559} und des mitochondriellen Cytochrom c werden sie hingegen nicht benötigt, was zeigt, daß sie spezifisch dem Reifungsmechanismus der plastidären c-Typ-Cytochrome zuzuordnen sind (Howe und Merchant, 1992; Xie *et al.*, 1998; Nakamoto *et al.*, 2000). Von diesen Faktoren konnten die korrespondierenden Gene *ccsA* und *CCS1* isoliert werden. CcsA besitzt Ähnlichkeit zum Faktor CcmF aus *E.coli* und *Bradyrhizobium japonicum* und stellt wahrscheinlich deren Funktionsanalogon dar (Xie und Merchant, 1996). Demgegenüber wurden für CCS1 in gram-negativen Bakterien keine eindeutigen Homologe gefunden, wohl aber in Cyanobakterien (Inoue *et al.*, 1997; Tichy und Vermaas, 1999). Die Gene *CCS2-4* konnten bislang nicht isoliert werden, damit besteht die Möglichkeit, daß es sich bei HCF164 um das Homolog aus höheren Pflanzen zu einem dieser drei Faktoren handelt.

Datenbanksuchen liefern einen weiteren Anhaltspunkt dafür, daß in der Plastide ein c-Typ-Cytochrom-Reifungs-Mechanismus existiert, der dem aus gram-negativen Bakterien entspricht. Das Plastom der Rotalge *Porphyra purpurea* enthält das Gen *ccdA* und homologe Sequenzen zu CcdA sind ebenfalls im Kerngenom von *Arabidopsis thaliana* gefunden worden (Schiott *et al.*, 1997, 1997a; Nakamoto *et al.*, 2000). Sie besitzen ebenfalls ein mögliches funktionelles Analogon in gram-negativen Bakterien, nämlich das Protein DipZ. Dieses transferiert Reduktionsäquivalente über die Cytoplasmamembran ins Periplasma und dient sehr wahrscheinlich als Elektronen-Donator für CcmG (Page *et al.*, 1997, 1998). Dies eröffnet die Möglichkeit, daß CcdA, analog zum bakteriellen Mechanismus, im Chloroplasten als Elektronen-Donator für HCF164 dient.

Damit ergibt sich für die Funktionsweise von HCF164 bei der Reifung von Cytochrom f im Thylakoidlumen folgendes Modell: HCF164 benutzt die von CcdA erhaltenen Reduktionsäquivalente zur Reduktion von Apocytochrom f und schafft damit die Voraussetzungen für den anschließenden Einbau der Häm-Gruppe und die Gewinnung eines funktionsfähigen Cytochrom f. Dieses Modell ist in Abb.19 veranschaulicht.

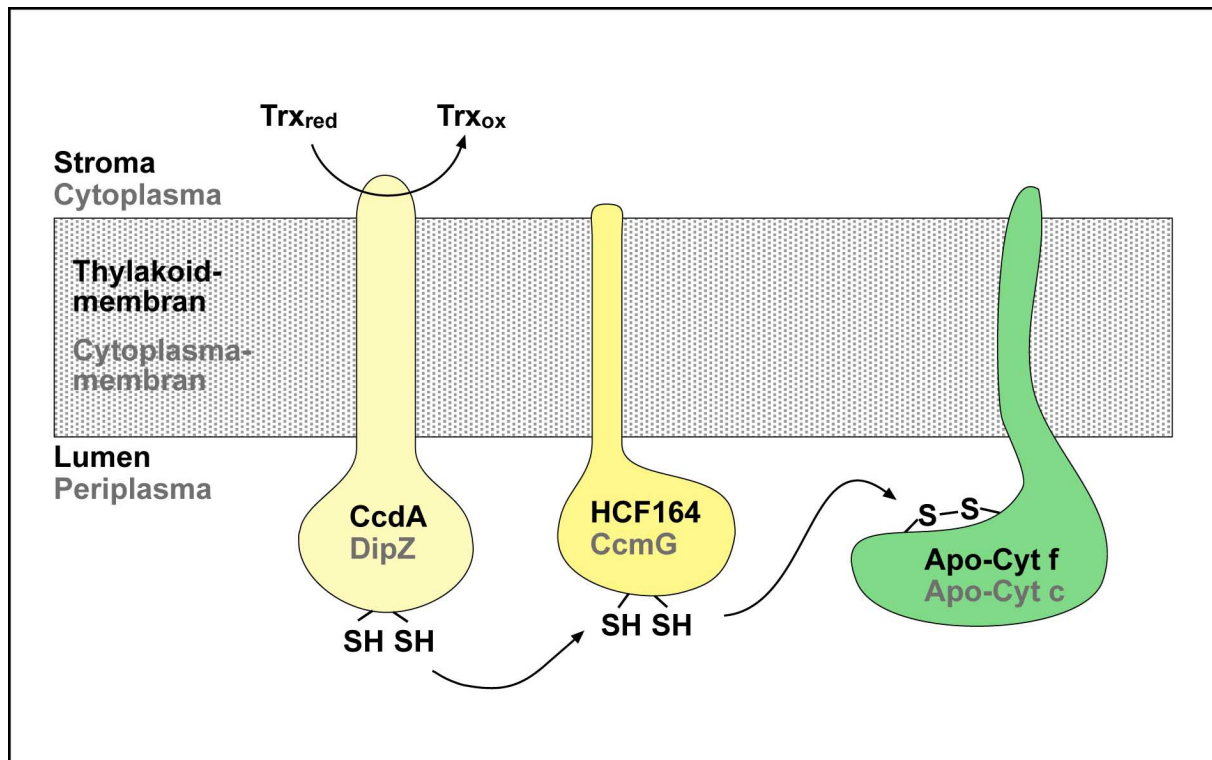


Abb. 19: Modell der Wirkungsweise von HCF164 bei der Reifung von Cytochrom f im Thylakoidlumen des Chloroplasten in Analogie zur Funktion von eubakteriellem CcmG bei der Reifung von Cytochrom c im Periplasma.

Zusammengefaßt ergeben die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten molekular-genetischen Untersuchungen der Mutante *hcf164* sowie die biochemischen und bioinformatischen Analysen des Faktors HCF164 einen eindeutigen Hinweis, daß in den Plastiden höherer Pflanzen und Algen der bakterielle Weg der c-Typ-Cytochrom-Reifung abläuft, an dem HCF164 als CcmG-Analog beteiligt ist. Derzeit ist noch nicht erwiesen, ob die plastidäre c-Typ-Cytochrom-Reifungsmaschinerie einfach nur ein Abbild ihres Gegenstückes aus gram-negativen Bakterien darstellt, oder aber ob im Laufe der Evolution neue eukaryoten-spezifische Komponenten hinzugekommen sind. Die Analyse weiterer *hcf*-Mutanten mit einem Defekt in der Biogenese des Cytochrom b_6f -Komplexes sollte nun eine geeignete Strategie darstellen, solche bislang nicht identifizierten Gene zu isolieren und so das Bild des Reifungsmechanismus von c-Typ-Cytochromen im Chloroplasten zu vervollständigen.

V. Zusammenfassung

Der Cytochrom b_6f -Komplex in der Thylakoidmembran des Chloroplasten setzt sich aus nukleär und plastidär kodierten Untereinheiten zusammen. Für seine Biogenese werden eine Reihe von nukleären Regel- und Hilfsfaktoren benötigt, die die Genexpression in Kern und Plastide miteinander koordinieren und gewährleisten, daß ein funktioneller Komplex aufgebaut wird. Zur Identifizierung dieser Biogenesefaktoren bietet sich die Analyse nukleärer Photosynthesemutanten an. Im Rahmen dieser Arbeit wurden mit Hilfe der T-DNA-Insertionsmutanten *hcf153* und *hcf164* von *Arabidopsis thaliana* zwei Faktoren isoliert und charakterisiert, die für die Biogenese des Cytochrom b_6f -Komplexes in den Chloroplasten höherer Pflanzen essentiell sind.

Spektroskopische Messungen der Chlorophyll-Fluoreszenz-Induktion und der P700-Redox-Kinetik einerseits sowie immunologische Analysen der Proteinspiegel andererseits zeigten, daß die Mutanten *hcf153* und *hcf164* spezifisch im Cytochrom b_6f -Komplex betroffen sind und die Akkumulation der Untereinheiten dieses Komplexes jeweils drastisch reduziert ist. Mittels Northern-Analysen und *in-vivo*-Proteinmarkierungsexperimenten wurde ermittelt, daß sich die Mutation jeweils auf der posttranslationalen Ebene der Genexpression auswirkt.

Nachdem bei beiden Mutanten der Nachweis der engen Kopplung von T-DNA-Insertion und Mutation erfolgt war, wurden die an die T-DNA angrenzenden Genombereiche mit Hilfe der inversen PCR isoliert. Diese genomischen Fragmente dienten zur Isolation der korrespondierenden cDNAs. Die Identität der isolierten cDNAs wurde durch die Komplementation von homozygoten Mutanten bestätigt.

In Datenbanksuchen wurden zu HCF153 keine Homologien mit bekannten Faktoren gefunden, die Rückschlüsse auf seine konkrete Funktion zuließen. Da auch keine Ähnlichkeiten zu cyanobakteriellen Proteinen gefunden wurden, ist davon auszugehen, daß es sich bei dem Faktor HCF153 um eine Neuerwerbung des Chloroplasten-Proteoms handelt, der für die posttranslationale Ebene der Biogenese des Cytochrom b_6f -Komplexes essentiell ist.

Der Faktor HCF164 ist homolog zum Thioredoxin-ähnlichen Protein TxIA aus *Synechocystis* sp., was seinen evolutionären Ursprung widerspiegelt. Außerdem besitzt HCF164 Ähnlichkeit zum Thioredoxin-ähnlichen Protein CcmG aus *E.coli*, das an der Reifung von c-Typ-Cytochromen im Periplasma beteiligt ist, wobei es die Cysteine im Häm-Bindemotiv CxxCH von Apocytochrom c reduziert. HCF164 besitzt Disulfid-Reduktase-Aktivität, was anhand von rekombinantem HCF164-Protein im Insulin-Reduktions-Test nachgewiesen wurde. Immunolokalisations-Experimente zeigten, daß HCF164 im Thylakoidlumen lokalisiert ist und dort mit der hydrophoben Domäne seines nicht abgeschnittenen Transitpeptids in der Thylakoidmembran verankert ist, womit es die gleiche Membrantopologie wie CcmG besitzt. Diese Ergebnisse legen nahe, daß HCF164 als Funktionsäquivalent des bakteriellen CcmG an der Reifung von Cytochrom f innerhalb der Biogenese des Cytochrom b_6f -Komplexes in den Chloroplasten höherer Pflanzen beteiligt ist.

VI. Literatur

Altschul, SF, Boguski, MS, Gish, W and Wootton, JC (1994) Issues in searching molecular sequence databases. *Nature Genet.* 6: 119-129

Anderson, JM (1986) Photoregulation of the composition, function and structure of thylakoid membranes. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 37: 93-136

Anderson, JM (1992) Cytochrome b_6f -complex: Dynamic molecular organization, function and acclimation. *Photosyn. Res.* 34: 341-357

Arnon, DI (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* 24: 1-13

Barkan, A, Miles, D, and Taylor, WC (1986) Chloroplast gene expression in nuclear, photosynthetic mutants of maize. *EMBO J.* 5: 1421-1427

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

Barkan, A (1993) Nuclear mutants of maize with defects in chloroplast polysome assembly have altered chloroplast RNA metabolism. *Plant Cell* 5: 389-402

Barkan, A, 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: 3170-3181

Barkan, A, Voelker, R, Mendel-Hartvig, J, Johnson, D and Walker, M (1995) Genetic analysis of chloroplast biogenesis in higher plants. *Physiol. Plant.* 93: 163-170

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

Bechtold, N, Ellis, J and Pelletier, G (1993) *In planta Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *C. R. Acad. Sci.* 316: 1194-1199

Beckman, DL and Kranz, RG (1993) Cytochrome c biogenesis in a photosynthetic bacterium requires a periplasmic thioredoxin-like protein. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 90: 2179-2183

Benton, WD and Davis, RW (1977) Screening lambda recombinant clones by hybridization to single plaques *in situ*. *J. Mol. and App. Gen.* 1: 483-498.

Berthold, DA, Schmidt, CL and Malkin, R (1995) The deletion of *petG* in *Chlamydomonas reinhardtii* disrupts the cytochrome b_6f -complex. *J. Biol. Chem.* 270: 29293-29298

Birnboim, HC and Doly, J (1979) A rapid alkaline extraction method for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* 7: 1513-1524

Bouchez, D, Camilleri, C and Caboche, M (1993) A binary vector based on basta resistance for *in planta* transformation of *Arabidopsis thaliana*. *C. R. Acad. Sci. Paris, Science de la vie/Life Sciences* 316: 1188-1193

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

- Bruce, BD and Malkin, R (1991) Biosynthesis of the chloroplast cytochrome b_6f complex: Studies in a photosynthetic mutant of *Lemna*. *Plant Cell* 3: 203-212
- 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.
- Choquet, Y, Stern, DB, Wostrikoff, K, Kuras, R, Girard-Bascou, J and Wollman, FA (1998) Translation of cytochrome *f* is autoregulated through the the 5' untranslated region of *petA* mRNA in *Chlamydomonas* chloroplasts. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 95: 4380-4385
- 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
- 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
- Collier, JL and Grossman, AR (1995) Disruption of a gene encoding a novel thioredoxin-like protein alters the cyanobacterial photosynthetic apparatus. *J. Bacteriol.* 177: 3269-3276
- Cramer, WA, Soriano, GM, Ponoramew, M, Huang, D, Zhang, H, Martinez, SE and Smith, JL (1996) Some new structural aspects and old controversies concerning the cytochrome b_6f -complex of oxygenic photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 477-508
- Danon, A and Mayfield, SP (1991) Light regulated translational activators: Identification of chloroplast gene specific mRNA binding proteins. *EMBO J.* 10: 3993-4001
- de Boer, D and Weisbeek, P (1991) Chloroplast rotein topogenesis: Import, sorting and assembly. *Biochim. Biophys. Acta* 1071: 221-253
- Dellaporta, SL, Wood, J and Hicks, JB (1983) A plant DNA miniprep: version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1: 19-21
- Deng, XW and Gruissem, W (1987) Control of plastid gene expression during development: The limited role of transcriptional regulation. *Cell* 49: 379-387
- Deng, XW, Stern, DB, Tonkyn, JC and Gruissem, W (1987) Plastid run-on transcription. Application to determine the transcriptional regulation of spinach plastid genes. *J. Biol. Chem.* 262: 9641-9648
- Dinkins, RD, Bandaranayake, H, Green, BR and Griffith, AJ (1994) A nuclear photosynthetic electron transport mutant of *Arabidopsis thaliana* with altered expression of the chloroplast *petA* gene. *Curr. Genet.* 25: 282-288
- Drager, RG, Girard-Bascou, J, Choquet, Y, Kindle, KL and Stern, JD (1998) In vivo evidence for 5'-3' exoribonuclease degradation of an unstable chloroplast mRNA. *Plant J.* 13: 85-96
- de Vitry, C, Breyton, C, Pierre, Y and Popot, JL (1996) The 4 kDa nuclear-encoded PetM polypeptide of the cytochrome b_6f -complex. Nucleic acid and protein sequences, targeting signals, transmembrane topology. *J. Biol. Chem.* 271 (18): 10667-10671
- 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

- Fabianek, RA, Huber-Wunderlich, M, Glockshuber, R Künzler, P, Hennecke, H and Thöny-Meyer, L (1997) Characterization of the *Bradyrhizobium japonicum* CycY protein, a membrane-anchored periplasmic thioredoxin that may play a role as a reductant in the biogenesis of c-type cytochromes. J. Biol. Chem. 272: 4467-4473
- Fabianek, RA, Hennecke, H and Thöny-Meyer, L (1998) The active-site cysteines of the periplasmic thioredoxin-like protein CcmG of *Escherichia coli* are important but not essential for cytochrome c maturation in vivo. J. Bacteriol. 180: 1947-1950
- 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, Doktorarbeit
- Feldman, KA (1991) T-DNA insertion mutagenesis in *Arabidopsis*: mutational spectrum. Plant J. 1: 71-82
- Feinberg, AP and Vogelstein, B (1983) A technique for radiolabelling DNA restriction nuclease fragments to high specific activity. Anal. Biochem. 132: 6-13
- Fields, S and Sternglanz, R (1994) The two-hybrid system: an assay for protein-protein interactions. Trends Genet. 10: 286-292
- Fisk, DG, Walker, MB and Barkan, A (1999) Molecular cloning of the maize gene *crp1* reveals similarity between mitochondrial and chloroplast gene expression. EMBO J. 18: 2621-2630
- Freedman, RB, Hirst, TR and Tuite, MF (1994) Protein disulphide isomerase: building bridges in protein folding. Trends Biochem. Sci. 19: 331-336
- Forsthoefel, NR, Wu, Y, Schulz, B, Benet, LM and Feldmann, KA (1992) T-DNA insertion mutagenesis in *Arabidopsis*: Prospects and Perspectives. Aus. J. Plant Physiol. 19: 353-366
- Genty, B, Harbinson, J, Briantis, JM and Baker, NR (1989) The relationship between non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence and the rate of photosystem II chemistry in leaves. Photosynth. Res. 25: 249-257
- Goldschmidt-Clermont, M (1998) Coordination of nuclear and chloroplast gene expression in plant cells. Int. Rev. Cytol. 177: 115-180
- Gray, JC (1992) Cytochrome f: Structure, function and biosynthesis. Photosynth. Res. 34: 359-374
- Gray, MW (1993) Origin and evolution of organelle genomes. Curr. Opin. Gen. Dev. 3: 884-890
- Gruissem W (1989): Chloroplast gene expression: How plants turn their plastids on. Cell 56: 161-170.
- Grüne, H and Westhoff, P (1988) Transfer von RNA auf Pall Biotyne A Nylonmembranen und Immobilisierung mittels UV-Crosslinking. Pall BioSupport SD 1217 G.
- Gumpel, NJ, Ralley, L, Girard-Bascou, J, Wollman, FA, Nugent, JHA and Purton, S (1995) Nuclear mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* defective in the biogenesis of the cytochrome *b₆f* complex. Plant Mol. Biol. 29: 921-932

- 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: 4041-4048
- 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.
- Hager, M, Biehler, K, Illerhaus, J, Ruf, S and Bock, R (1999) Targeted inactivation of the smallest plastid genome-encoded open reading frame reveals a novel and essential subunit of the cytochrome b_6f -complex. *EMBO J.* 18:5834-5842
- Haley, J and Bogorad, L (1989) A 4 kDa chloroplast polypeptide associated with the cytochrome b_6f -complex. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 86: 1534-1538
- Hanahan, D, Jessee, J and Bloom, FR (1991) Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Meth. Enzymol.* 204: 63-113.
- Hanley-Bowdoin, L and Chua, NH (1987) Chloroplast promoters. *Trends Biochem. Sci.* 12: 67-70
- Harbinson, J and Woodward, FI (1987) The use of light-induced absorbance changes at 820 nm to monitor oxidation state of P700 in leaves. *Plant, Cell and Environment* 10: 131-140
- 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
- Hauska, G, Schütz, M and Büttner, M (1996) The cytochrome b_6f -complex - composition, structure and function. In: Ort, DR and Yocum, CF (Eds) *Oxygenic photosynthesis: The light reactions*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 377-398.
- Herrmann, RG, Westhoff, P, Alt, J, Tittgen, J and Nelson, N (1985) Thylakoid membrane proteins and their genes. In: van Vloten-Doting L, Groot, GSP and Hall, TC (Eds) *Molecular form and function of the plant genome*. Plenum Publishing Corporation, New York, pp. 233-256
- Hess, WR, Hosch, B, Zeltz, P, Hübschmann, T, Kössel, H and Börner, T (1994) Inefficient rp12 splicing in barley mutants with ribosome-deficient plastids. *Plant Cell* 6: 1455-1465
- Holmes, DS and Quigley, M (1981) A rapid boiling method for the separation of bacterial plasmids. *Anal Biochem* 114: 193-197.
- Holmgren, A (1979) Thioredoxin catalyses the reduction of insulin disulfides by dithiothreitol and dihydrolipoamide. *J. Biol. Chem.* 254: 9627-9632
- Holmgren, A (1985) Thioredoxins. *Annu. Rev. Biochem.* 54: 237-271
- Holmgren, A (1989) Thioredoxin and glutaredoxin systems. *J. Biol. Chem.* 264: 13963-13966
- Howe, G and Merchant, S (1992) The biosynthesis of membrane and soluble plastidic c-type cytochromes of *Chlamydomonas reinhardtii* is dependent on multiple common gene products. *EMBO J.* 11: 2789-2801
- Howe, G, Mets, L and Merchant, S (1995) Biosynthesis of cytochrome f in *Chlamydomonas reinhardtii*: analysis of the pathway in gabaculine-treated cells and in the heme attachment mutant B6. *Mol. Gen. Genet.* 246: 156-165

- Hynds, PJ, Plücken, 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
- Igloi, GL and Kössel, H (1992) The transkriptional apparatus of chloroplasts. *Crit. Rev. Plant Sci.* 10: 525-558
- Inoue, K, Dreyfuss, BW, Kindle, KL, Stern, DB, Merchant, S and Sodeinde, OA (1997) *CCS1*, a nuclear gene required for the post-translational assembly of chloroplast c-type cytochromes. *J. Biol. Chem.* 272: 31747-31754
- Isono, K, Shimizu, M, Yoshimoto, K, Niwa, Y, Satoh, K, Yokota, A and Kobayashi, H (1997) Leaf-specially expressed genes for polypeptides destined for chloroplasts with domains of σ^{70} factors of bacterial RNA polymerases in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 94: 14948-14953
- 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
- Jenkins, BD, Kulhanek, DJ and Barkan, A (1997) Nuclear mutations that block group II RNA splicing in maize chloroplasts reveal several intron classes with distinct requirements for splicing factors. *Plant Cell* 9: 283-296
- Jones, JDG, Gilbert, DE, Grady, KL and Jorgensen, RA (1987) T-DNA structure and gene expression in petunia plants transformed by *Agrobacterium tumefaciens* C58 derivatives. *Mol. Gen. Genet.* 207: 478-485
- Jorgensen, R, Snyder, S and Jones, JDG (1987) T-DNA is organized predominantly in inverted repeat structures in plants transformed with *Agrobacterium tumefaciens* C58 derivatives. *Mol. Gen. Genet.* 207: 471-477
- Kirk, JTO and Tilney-Bassett RAE (1978): The plastids: their chemistry, structure, growth and inheritance. Elsevier / North Holland Biomedical Press, Amsterdam.
- Koncz, C, Mayerhofer, R, Koncz-Kalman, Z, Nawrath, C, Reiss, B, Redei, GP and Schell, J (1990) Isolation of a gene encoding a novel chloroplast protein by T-DNA tagging in *Arabidopsis thaliana*. *EMBO J.* 9: 1337-1346
- Koncz, C, Németh, K, Rédei, GP and Schell, J (1992) T-DNA insertional mutagenesis in *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.* 20: 963-976
- Koncz, C, Martini, N, Szabados, L, Hrouda, 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
- Kranz, R, Lill, R, Goldman, B, Bonnard, G and Merchant, S (1998) Molecular mechanisms of cytochrome c biogenesis: three distinct systems. *Mol. Microbiol.* 29: 383-396
- Kudla, J, Hayes, R and Grissem, W (1996) Polyadenylation accelerates degradation of chloroplast RNA. *EMBO J.* 15: 7137-7146
- Kuras, R and Wollman, FA (1994) The assembly of cytochrome b6/f complexes: an approach using genetic transformation of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *EMBO J.* 13: 1019-1027
- Kuras, R, de Vitry, C, Choquet, Y, Girard-Bascou, J, Culler, D, Buschlen, S, Merchant, S and Wollman, FA (1997) Molecular and genetic identification of a pathway for heme binding to cytochrome b₆. *J. Biol. Chem.* 272: 32427-32435

Laemmli, UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685

Lennartz, K (1997) Die Rolle des nukleären Gens *HCF153* bei der Biogenese des Cytochrom b_6f -Komplexes in *Arabidopsis thaliana*. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Diplomarbeit

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

Maier, RM, Necheremann, K, Igloi, GL and Kössel, H (1995) Complete sequence of the maize chloroplast genome: Gene content, hotspots of divergence and fine tuning of genetic information by transcript editing. *J. Mol. Biol.* 251: 614-628

Malkin, R (1992) Cytochrome bc_1 and b_6f complexes of photosynthetic membranes. *Photosyn. Res.* 33: 121-136

Marchuk, D, Drumm, M, Saulino, A and Collins, FS (1990) Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products. *Nucleic Acids Res.* 19: 1154

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, Stoebe, B, Goremykin, V, Hansmann, S, Hasegawa, M and Kowallik, KV (1998) Gene transfer to the nucleus and the evolution of chloroplasts. *Nature* 393: 162-165

Mayfield, SP, Cohen, A, Danon, A and Yohn, VCB (1994) Translation of the *psbA* mRNA of *Chlamydomonas reinhardtii* requires a structured RNA element contained within the 5' untranslated region. *J. Cell Biol.* 127: 1537-1545

McMaster, GK and Carmichael, GG (1977) Analysis of single and double-stranded nucleic acids on polyacrylamide and agarose gels by using glyoxal and acridine orange. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 74: 4835-4838.

Meerman, HJ and Georgiou, G (1994) Construction and characterization of a set of *E.coli* strains deficient in all known loci affecting the proteolytic stability of secreted recombinant proteins. *Biotechnology* 12: 1107-1110

Mereschkowsky, C (1905) Über die Natur und den Ursprung der Chromatophoren im Pflanzenreiche. *Biol. Centr.* 25: 593-604 und 689-691

Meurer, J, Meierhoff, K and Westhoff, P (1996) 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 thylakoid membrane assembly and function. *Maydica* 39: 35-45

- Monika, EM, Goldman, BS, Beckman, DL and Kranz, RG (1997) A thiorredoxin pathway tethered to the membrane for periplasmic cytochromes c biogenesis, *in vitro* and *in vivo* studies. *J. Mol. Biol.* 271: 679-692
- Moore, JT, Uppal, A, Maley, F and Maley, GF (1993) Overcoming inclusion body formation in a high-level expression system. *Protein Expr. Purif.* 4: 160-163
- Mullet JE (1988) Chloroplast development and gene expression. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 39: 475-502
- Mullet, JE and Klein, RR (1987) Transcription and RNA stability are important determinants of higher plant chloroplast RNA levels. *EMBO J.* 6: 1571-1579
- Murashige, T and Skoog, F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497
- Nakamoto, SS, Hamel, P and Merchant, S (2000) Assembly of chloroplast cytochromes b and c. *Biochimie* 82: 603-614
- Nickelsen, J, van Dillewijn, J, Rahire, M and Rochaix, JD (1994) Determinants for the stability of the chloroplast *psbD* RNA are located within its short leader region in *Chlamydomonas reinhardtii*. *EMBO J.* 13: 3182-3191
- Ochman, H, Gerber, AS and Hartl, DL (1988) Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. *Genetics* 120: 621-623.
- Ochman, H, Ayaly, FH and Hartl, DL (1993) Use of polymerase chain reaction to amplify segments outside boundaries of known sequences. *Methods Enzymol.* 218: 309-321
- Ohme, M, Tanaka, M, Chunwongse, J, Shinozaki, K and Sugiura, M (1986) A tobacco chloroplast DNA sequence possibly coding for a polypeptide similar to *E.coli* RNA polymerase β -subunit. *FEBS Lett.* 200: 87-90
- Page, MD and Ferguson, SJ (1997) *Paracoccus denitrificans* CcmG is a periplasmic protein-disulfide oxidoreductase required for c- and aa3-type cytochrome biogenesis; evidence for reductase role *in vivo*. *Mol. Microbiol.* 24: 977-990
- Page, DM, Sambongi, Y and Ferguson, SJ (1998) Contrasting routes of c-type cytochrome assembly in mitochondria, chloroplasts and bacteria. *Trends Biochem. Sci.* 23: 103-108
- Pierre, Y and popot, JL (1993) Identification of two 4-kDa miniproteins in the cytochrome b_6f -complex from *Chlamydomonas reinhardtii*. *C. R. Acad. Sci.* 316: 1404-1409
- Robinson, C and Mant, A (1997) Targeting of proteins into and across the thylakoid membrane. *Trends Plant Sci.* 2: 431-437
- 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
- Rochaix, JD (1996) Post-transcriptional regulation of chloroplast gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Mol. Biol.* 32: 327-341
- Saiki, RK, Gelfand, DH, Stoffel, S, Scharf, SJ, Higuchi, RG, Horn, GT, Mullis, KB and Erlich, HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 230: 1350-1354

- Sambrook, J, Fritsch, EF and Maniatis, T (1989) Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor
- Sanger, F, Nickeln, S and Coulson, AR (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. Proc. Natl Acad. Sci. USA 74: 5463-5467.
- Schiott, T, von Wachenfeldt, C and Hederstedt, L (1997) Identification and characterization of the *ccdA* gene, required for cytochrome c synthesis in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 179: 1962-1973
- Schiott, T, Throne-Holst, M and Hederstedt, L (1997a) *Bacillus subtilis* CcdA-defective mutants are blocked in a late step of cytochrome c biogenesis. J. Bacteriol. 179: 4523-4529
- Schöneberg, U, Vahrson, W, Friedemuth, 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,
- Schreiber, U, Klughammer, C and Neubauer, C (1988) Measuring P700 absorbance changes around 800 nm with a new type of pulse modulation system. Z. Naturforsch. 43C: 686-698
- Schuster, G and Grussem, W (1991) Chloroplast mRNA 3'end processing requires a nuclear-encoded RNA-binding protein. EMBO J. 10: 1493-1502
- Seidler, A (1994) Introduction of a histidine tail at the N-terminus of a secretory protein expressed in *Escherichia coli*. Protein Engng 7: 1277-1280
- 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
- Sijben-Müller, G, Hallick, RB, Alt, J, Westhoff, P and Herrmann, RG (1986) Spinach plastid genes coding for initiation factor IF-1, ribosomal protein S11 and RNA polymerase α -subunit. Nucl. Acids Res. 14: 1029-1044
- Somerville CR (1986): Analysis of photosynthesis with mutants of higher plants and algae. Annu Rev Plant Physiol 37: 467-507.
- Southern, EM (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98: 503-517.
- Stern, DB, Jones, H and Grussem, W (1989) Function of plastid mRNA 3' inverted repeats. RNA stabilization and gene specific protein binding. J. Biol. Chem. 264: 18742-18750
- Stern, DB, Higgs, DC and Yang, J (1997) Transcription and translation in Chloroplasts. Trends Plant Sci. 2: 308-315
- 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* δ -endotoxin, confers Spodoptera resistance in alfalfa and tobacco. Proc. Natl Acad. Sci. USA 93: 15012-15017
- Sugiura, M (1992) The chloroplast genome. Plant Mol. Biol. 19: 149-168

- Takahashi, Y, Rahire, M, Breyton, C, Popot, JL, Joliot, P and Rochaix, JD (1996) The chloroplast *ycf7* (*petL*) open reading frame of *Chlamydomonas reinhardtii* encodes a small functionally important subunit of the cytochrome b_6f -complex. EMBO J. 15: 3498-3506
- Tanaka, K, Tozawa, Y, Mochizuki, N, Shinozaki, K, Nagatani, A, Wakasa, K and Takahashi, H (1997) Characterization of three cDNA species encoding plastid RNA polymerase sigma factors in *Arabidopsis thaliana*: Evidence for the sigma factor heterogeneity in plastids. FEBS Lett. 413: 309-313
- Taylor WC (1989): Regulatory interactions between nuclear and plastid genomes. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 40: 211-233.
- Tichy, M and Vermaas, W (1999) Accumulation of pre-apocytochrome f in a *Synechocystis* sp. PCC 6803 mutant impaired in cytochrome c maturation. J. Biol. Chem. 274: 32396-32401
- 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
- Thomson, WW and Whatley, JM (1980) Development of non-green plastids. Ann. Rev. Plant Physiol. 31: 375-394
- 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
- van Kooten, O and Snel, JFH (1990) The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. Photosynth. Res. 25: 147-150
- Voelker, R and Barkan, A (1995a) Nuclear genes required for post-translational steps in the biogenesis of the chloroplast b_6f complex in maize. Mol. Gen. Genet. 249: 507-514
- 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
- Willey, DL and Gray, JC (1990) An open reading frame encoding a putative haem-binding polypeptide is cotranscribed with the pea chloroplast gene for apocytochrome f. Plant Mol. Biol. 15: 347-356
- Wollman, FA, Limor, M and Nechushtai, R (1999) The biogenesis and assembly of photosynthetic proteins in thylakoid membranes. Biochim. Biophys. Acta 1411: 21-85
- Xie, Z and Merchant, S (1996) The plastid encoded *ccsA* gene is required for heme attachment to chloroplast c-type cytochromes. J. Biol. Chem. 271: 4632-4639
- Xie, Z, Culler, D, Dreyfuss, BW, Kuras, R, Wollman, FA, Girard-Bascou, J and Merchant, S (1998) Genetic analysis of c-type cytochrome assembly in *Chlamydomonas reinhardtii*: One chloroplast locus and at least four nuclear loci are required for heme attachment. Genetics 148: 681-692
- Xie, Z and Merchant, S (1998) A novel pathway for cytochromes c biogenesis in chloroplasts. Biochim. Biophys. Acta 1365: 309-310

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

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand am Institut für Entwicklungs- und Molekularbiologie der Pflanzen unter der wissenschaftlichen Betreuung von Prof. Dr. Peter Westhoff. Ihm danke ich für stets motivierende Impulse und zahlreiche Ratschläge, die sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Bei Herrn PD Dr. Thomas Lisowsky bedanke ich mich für die Übernahme des Koreferates.

Frau Dr. Karin Meierhoff möchte ich dafür danken, daß sie mir die Mutanten *hcf153* und *hcf164* und damit verbunden eine interessante Themenstellung für diese Arbeit zur Verfügung gestellt hat.

Herrn Dr. Andreas Seidler danke ich für die angenehme Zusammenarbeit bei der Funktionsanalyse des HCF164-Proteins und vor allem für die in diesem Zusammenhang von ihm durchgeführten Proteinaufreinigungen und in vitro-Tests.

Außerdem danke ich allen ehemaligen und jetzigen Mitarbeitern der Botanik IV, die durch die angenehme Arbeitsatmosphäre dazu beigetragen haben, daß ich mich am Institut sehr wohl gefühlt habe und viel Spaß beim Erstellen dieser Arbeit hatte.

Meinen herzlichen Dank richte ich an meine Eltern dafür, daß sie mir das Studium ermöglicht und mich stets unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Henning Plücken für seinen steten Optimismus, seine große Motivation und sehr viel Geduld.

Eidesstattliche Erklärung:

Ich versichere, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur mit den angegebenen Quellen und Hilfsmitteln angefertigt habe.

Düsseldorf, November 2000

Katja Lennartz