

**Molekularbiologische und biochemische Analyse
des plastidären Tetratricopeptid-Repeat-
Proteins HCF107
aus *Arabidopsis thaliana***

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

vorgelegt von
Bernhard Stein
aus Krefeld
2004

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

1. Berichterstatter: Prof. Dr. P. Westhoff

2. Berichterstatter: Prof. Dr. R. Wagner

Tag der mündlichen Prüfung: 14.7.2004

Abkürzungen

α -32P-dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat, markiert mit radioaktivem Phosphor
A	Ampere
Aqua bidest.	zweifach destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
°C	Grad Celsius
Δ pH	pH-Gradient
Cyt b ₆	Cytochrom b ₆
Cyt b ₆ f	Cytochrom b ₆ f-Komplex
Cyt f	Cytochrom f
DTE	Dithioerythrit
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	<i>Bis</i> -(aminoethyl)-glycoether- <i>N,N,N',N'</i> -tetraessigsäure
F	Fluoreszenz im Elektronenfließgleichgewicht
F ₀	Grundfluoreszenz
F _m	maximale Fluoreszenz
F _v	variable Fluoreszenz
g	Gramm
<i>g</i>	Gravitationsbeschleunigung
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
hcf	Hoch-Chlorophyll-Fluoreszenz (high chlorophyll fluorescence)
<i>hcf</i>	Bezeichnung der Mutante
<i>HCF</i>	Bezeichnung des Gens
HCF	Bezeichnung des Genproduktes
Hepes	<i>n</i> -2-Hydroxyethyl-piperazin- <i>n</i> -2-ethansulfonsäure
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
M	molar
mA	Milliampere
μ E	Mikroeinstein
MES	2- <i>N</i> -Morpholinoethansulfonsäure
min	Minute
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
nt	Nulkeotide
OD	Optische Dichte

pa	Für die Analyse
PAM	Puls-Amplituden-Modulator
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFD	Photonenflussdichte
PS	Photosystem
RT	Reverse Transkriptase
RubisCO	Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec.	Sekunde
SRP	Signal Recognition Particle
sscDNA	einzelsträngige, komplementäre DNA
Tricin	<i>N</i> -Tris(hydroxymethyl)methylglycin
Tris	<i>N</i> -Tris(hydroxymethyl)aminoethan
U	Enzymeinheit
UE	Untereinheit
UV	ultraviolett
UpM	Umdrehung pro Minute
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	5
I. Einleitung.....	7
1. Regulationsmechanismen der plastidären Genexpression	7
2. Die Mutante <i>hcf107</i> aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	13
3. Ziele dieser Arbeit.....	17
II. Material und Methoden.....	18
1. Material	18
1.1 Chemikalien und Enzyme	18
1.2 Saatgut	18
1.3 Bakterienstämme und Plasmide	19
1.4 Antiseren	19
1.5 Oligonukleotide	20
2. Pflanzenanzucht und Selektion von <i>hcf</i> -Mutanten	21
3. Chlorophyll-Fluoreszenz-Induktionsmessungen	21
4. Transformation von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	22
5. Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i>	22
6. Computergestützte Sequenzanalysen.....	23
7. Molekularbiologische Grundtechniken.....	23
8. DNA-Analysen	24
8.1 DNA-Isolierung aus Einzelpflanzen	24
8.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	24
8.3 PCR-gestützte Genotypisierung von <i>hcf</i> -Mutanten.....	25
9. RNA-Analysen	27
9.1 Isolation von Gesamt- und Poly (A ⁺)-RNA.....	27
9.2 Herstellung von einzelsträngiger cDNA	27
9.3 Northern-Analysen.....	28
10. Protein-Analysen	29
10.1 Isolierung von Membranproteinen aus Rohhomogenaten	29
10.2 Isolierung von Chloroplasten	29
10.3 Konzentrationsbestimmung von Chlorophyll.....	30
10.4 Konzentrationsbestimmung von Proteinen	30
10.5 Fraktionierung der Chloroplasten in Stroma und Membranen - Salzwäsche von Chloroplastenmembranen	30
10.6 Detergenz-Solubilisierung plastidärer Proteine.....	31
10.7 Auftrennung plastidärer Membrankomplexe über Zentrifugation in einem Saccharosegradienten	31
10.8 Blue-Native Gelelektrophorese	32
10.9 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	32
10.10 Immunoblot-Analyse von Proteinen	33
10.11 Affinitätschromatographie Protein A-etikettierter Proteine an IgG-Sepharose	34

10.11.1	Vorbereitung der IgG-Sepharose	34
10.11.2	IgG-Affinitätschromatographie	34
10.11.3	Nachweis von Plastiden-RNAs mittels RT-PCR	35
III.	Ergebnisse	36
1.	Klonierung einer <i>HCF107</i> -cDNA mit vollständigem Leseraster und Expressionsanalyse des Gens <i>HCF107</i> in den Mutanten <i>hcf107-1</i> und <i>hcf107-2</i>	36
2.	Komplementation der Mutante <i>hcf107-2</i> und Herstellung Epitop-markierter Komplementanten-Linien	37
3.	Herstellung Epitop-markierter Kontrolllinien: <i>hcf152</i> und <i>hcf155</i>	43
5.	Der Wirkort des HCF107-Proteins	46
6.	Nachweis und Größenbestimmung des HCF107-Komplexes.....	48
6.1	Auswahl geeigneter Solubilisierungsbedingungen.....	48
6.2.	Auftrennung Digitonin-solubilisierter Chloroplastenproteine mittels Blue-Native-Gelelektrophorese	50
6.2	Zentrifugation Digitonin-solubilisierter Chloroplastenproteine im Saccharosedichtegradienten	52
7.	Affinitätschromatographische Versuche zur Ermittlung von HCF107-Interaktoren.....	54
7.1	Analytische IgG-Affinitätschromatographie - Auswahl geeigneter Elutionsbedingungen	54
7.2	Präparative IgG-Affinitätschromatographie zur Ermittlung von interagierenden Proteinen	55
7.3	RT-basierter Nachweis plastidärer Transkripte.....	57
IV.	Diskussion	60
1.	Nukleäre Mutanten geben Einblicke in die Wirkungsweise posttranskriptioneller Regulationsmechanismen	60
2.	Die Mutante <i>hcf107</i> aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	61
3.	Funktionelle Analyse des nukleär kodierten Biogenesefaktors HCF107 aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	63
3.1	Herstellung Epitop-markierter Komplementationslinien	63
3.2	HCF107 ist im Chloroplasten mit Membranen assoziiert	64
3.3	Das TPR-Protein HCF107 ist Bestandteil eines höhermolekularen Komplexes	65
3.4	Affinitätschromatographische Versuche zur Identifizierung möglicher HCF107-Interaktoren	67
4.	Die Funktion des nukleär kodierten Faktors HCF107 in der post-transkriptionellen Regulation der plastidären Genexpression.....	68
V.	Zusammenfassung	70
VI.	Anhang	72
VII.	Literatur	74

I. Einleitung

1. Regulationsmechanismen der plastidären Genexpression

Die Entwicklung und Differenzierung der Proplastide zum fertigen Chloroplasten ist ein komplexer, in Abhängigkeit von Umweltfaktoren wie Licht und Temperatur, ablaufender Prozess. Insbesondere aufgrund der Tatsache, dass sich viele plastidäre Proteinkomplexe als Ursache des erfolgten Gentransfers von der Plastide in den Kern sowohl aus plastidär- als auch nukleär kodierten Untereinheiten zusammensetzen (Herrmann *et al.* 1985; Erickson and Rochaix 1992), ist eine strenge zeitliche, räumliche sowie stöchiometrische Koordination der plastidären und nukleären Genexpression erforderlich (Goldschmidt-Clermont 1998).

Daher wird die plastidäre Genexpression im Verlaufe der Chloroplastenbiogenese durch eine Vielzahl nukleär kodierter Faktoren reguliert bzw. moduliert. Dies zeigt sich vor allem an den Untersuchungen zahlreicher, in der Funktion und Entwicklung ihrer Chloroplasten gestörter, nukleärer Mutanten aus Mais (Barkan *et al.* 1995; Barkan 1998), *Arabidopsis thaliana* (Felder *et al.* 2001; Meierhoff *et al.* 2003) und *Chlamydomonas reinhardtii* (Barkan and Goldschmidt-Clermont 2000; Rochaix 2002). Der Eingriff dieser nukleär kodierten Biogenesefaktoren erfolgt dabei auf den verschiedensten Ebenen der plastidären Genexpression, wie der Transkription, bei posttranskriptionellen Prozessen wie der RNA-Prozessierung und RNA-Stabilität, sowie der Translation und auf posttranslationeller Ebene wie z.B. der Proteinreifung oder Proteinstabilität. Weiterhin bieten sowohl der Transport der synthetisierten Proteine an ihren Zielort, als auch die koordinierte Assemblierung der Proteinkomplexe Angriffspunkte für regulative Eingriffe (Wollman *et al.* 1999).

Die Kontrolle der plastidären Transkription bietet dabei die erste Möglichkeit für einen Eingriff in die Genexpression der Plastide. Plastidäre Gene sind aufgrund ihrer postendosymbiontischen Assemblierung der cyanobakteriellen Vorläufergene überwiegend in polycistronischen Transkriptionseinheiten zusammengefasst (Douglas 1994). Diesen ist meist ein Promotor vorgeschaltet, der in seinem Aufbau mit konservierten -35 und -10 Bereichen prokaryotischen Promotoren ähnelt, die von Sigma-artigen Transkriptionsfaktoren erkannt werden (Hanley-Bowdoin and Chua 1987). Weiterhin findet man Transkriptionseinheiten, die im Gegensatz zu nukleären Genen, multiple Promotoren besitzen und die eine selektive Transkription einzelner oder überlappender Transkripte ermöglichen (Haley and Bogorad 1990). Daneben existiert jedoch auch eine Vielzahl plastidärer Gene bzw. Transkriptionseinheiten, deren Promotorregionen keine Ähnlichkeiten zu prokaryotischen Promotorstrukturen aufweisen und somit eine zweite Klasse von plastidären Promotoren bilden (Kapoor *et al.* 1997). Die Existenz dieser beiden unterschiedlichen Promotorklassen lässt sich anhand der Tatsache erklären, dass die Transkription der plastidären Gene durch zwei unterschiedliche RNA-Polymerasen erfolgt.

Passend zu den prokaryotischen Promotorstrukturen besitzen die Chloroplasten höherer Pflanzen eine RNA-Polymerase, deren plastidär kodierte Untereinheiten starke Homologien zur RNA-Polymerase aus *Escherichia coli* aufweisen. Wie Transkriptionsanalysen zeigen ist diese RNA-Polymerase vor allem für die Transkription der Photosynthesegene zuständig (Hajdukiewicz *et al.* 1997). Mittlerweile konnten auch die Gene für die passenden Sigma-artigen Faktoren im Genom von Rotalgen (Tanaka *et al.* 1996; Oikawa *et al.* 1998) und höheren Pflanzen identifiziert werden (Isono *et al.* 1997; Tanaka *et al.* 1997; Fujiwara *et al.* 2000). Dabei wird die Expression dieser Faktoren zum Teil wiederum durch äußere Faktoren, wie Licht, aber auch durch den Entwicklungsgrad der Plastide und den Plastidentyp beeinflusst.

Die zweite plastidäre RNA-Polymerase ist nukleär kodiert und ist für die Transkription der Gene mit alternativer Promoterstruktur zuständig. Hierbei handelt es sich vorwiegend um Gene deren Produkte Komponenten des plastidären Transkriptions- und Translationsapparates sind. Hierzu zählen unter anderen die Gene des *rpoB*-Operon, die für Untereinheiten der eubakteriellen RNA-Polymerase kodieren (Hess *et al.* 1993). Daneben findet man aber auch Gene, die sowohl Promotoren für die plastidär- als auch für die nukleär kodierte RNA-Polymerase besitzen und auch von beiden transkribiert werden können. Hierzu zählen die Gene *atpB* und *atpI* der plastidären ATP-Synthase (Allison *et al.* 1996; Hajdukiewicz *et al.* 1997). Über den genauen Aufbau der nukleär kodierten RNA-Polymerase ist bisher nur wenig bekannt. Aus Spinat konnte das Enzym als ein 110 kDa großes Polypeptid biochemisch aufgereinigt werden. Aufgrund seiner biochemischen Eigenschaften und seiner Empfindlichkeit gegenüber bestimmten Inhibitoren weist das Enzym große Ähnlichkeiten zur Phagen-T3/T7-RNA-Polymerase auf (Lerbs-Mache 1993; Liere and Maliga 1999).

Die Bedeutung der Regulation der plastidären Transkription zeigt sich anhand der unterschiedlichen Transkriptionsraten der plastidären Gene, die sich bis um den Faktor 300 unterscheiden können und zum Teil drastische Veränderungen im Laufe der lichtabhängigen Entwicklung und Differenzierung der Proplastide zum Chloroplasten unterworfen sind (Baumgartner *et al.* 1989; Rapp *et al.* 1992). Demzufolge wird die plastidäre Genexpression im Verlauf der Chloroplastebogenese zumindest teilweise auf der Transkriptionsebene reguliert bzw. moduliert.

Eine weitaus größere Bedeutung für die plastidäre Genexpression hat jedoch die Regulation auf posttranskriptioneller Ebene. Dies verdeutlicht sich durch die Beobachtung, dass die Transkriptionsraten vieler plastidärer Gene während der Chloroplastebogenese weitgehend konstant bleiben und dennoch große Unterschiede in den Transkriptspiegeln der betroffenen Gene zu erkennen sind (Deng and Gruissem 1987). Plastidäre Gene sind, wie bereits erwähnt, fast ausschließlich in polycistronischen Transkriptionseinheiten angeordnet. Somit

muss nach der Transkription das polycistronische Primärtranskript in den nichtkodierenden Bereichen durch Ribonukleasen zunächst endonukleolytisch in oligocistronische Transkripte gespalten werden. In Folge werden diese dann wiederum an ihren freien 5'- und 3'-Enden exonukleolytisch geschnitten und so in eine für die Translationsmaschinerie verwertbare Form überführt. Determinanten für die Prozessierung und Stabilität eines Transkriptes befinden sich sowohl im 3'- als auch im 5'-untranslatierten Bereich der jeweiligen mRNA. So besitzen nahezu alle plastidären Transkripte im 3'-untranslatierten Bereich eine umgekehrte Sequenzwiederholung zur Ausbildung einer Sekundärstruktur, der so genannten Bäumchenstruktur. Diese dient dem Schutz vor Degradation durch 3'-5'-Exoribonukleasen und der Erzeugung definierter 3'-Enden (Stern *et al.* 1989). Die 3'-Prozessierung plastidärer Transkripte ist notwendig da in Chloroplasten im Gegensatz zu Prokaryoten die Termination bei der Transkription nur sehr ineffizient vonstatten geht (Stern and Grussem 1987; Rott *et al.* 1996). So konnte für die Transkripte *atpB* und *rbcL* in *C. reinhardtii* gezeigt werden, dass nur die 3'-prozessierten Transkripte mit Polysomen assoziiert sind und translatiert werden (Rott *et al.* 1998).

Am Beispiel der *petD*-mRNA aus Spinat wurde die 3'-Prozessierung detaillierter untersucht. Der 3'-untranslatierte Bereich des reifen Transkripts endet direkt stromabwärts der Bäumchenstruktur und wird entweder durch 3'-5'-gerichteten exonukleolytischen Abbau oder durch endonukleolytische Spaltung und anschließender 3'-5'-Exoribonukleaseaktivität erzeugt (Monde *et al.* 2000). Biochemisch konnten drei Proteine der Größe 29, 41 und 55 kDa identifiziert werden, die an die Bäumchenstruktur und stromabwärts gerichtete Bereiche des unprozessierten 3'-Endes binden. Das 41 kDa Protein besitzt RNA-Binde- und Endoribonukleaseaktivität, und wird vermutlich durch die beiden anderen Proteine reguliert (Chen *et al.* 1995; Hayes *et al.* 1996; Yang *et al.* 1996). Das 55 kDa Protein ist möglicherweise verwandt zu einem 54 kDa Protein aus Senf, das ebenfalls an den 3'-untranslatierten Bereich verschiedener plastidärer Transkripte bindet und Ribonukleaseaktivität besitzt. Dabei wird diese Aktivität wahrscheinlich, wie *in vitro* Untersuchungen zeigen, durch den Phosphorylierungsgrad und den Redox-Zustand des Proteins reguliert (Nickelsen and Link 1993; Liere and Link 1997).

Daneben wurden jedoch auch Proteine identifiziert, die nicht direkt in die 3'-Prozessierung involviert sind, sondern durch Bindung des 3'-untranslatierten Bereiches das Transkript stabilisieren. So wurden in Gerste Proteine der Größen 37 und 38 kDa nachgewiesen, die im Licht spezifisch den 3'-untranslatierten Bereich der *psbA*-mRNAs stromaufwärts der Bäumchenstruktur binden und wahrscheinlich so die Stabilität der 3'-prozessierten Transkripte erhöhen (Memon *et al.* 1996). Die 3'-untranslatierte Region ist nicht nur wichtig für die Prozessierung eines Transkriptes sondern ist auch für den Abbau der RNA von Bedeutung. So besitzen einige plastidäre Transkripte Polyadenylierungsstellen, an die

vermutlich nach endonukleolytischer Spaltung ein Poly A-Schwanz angefügt wird, der das entsprechende Transkript für den exonukleolytischen Abbau markiert (Kudla *et al.* 1996; Hayes *et al.* 1999; Schuster *et al.* 1999).

Auch der 5'-untranslatierte Bereich der plastidären mRNAs trägt Determinanten für die Prozessierung und Stabilität der Transkripte. So weisen eine Vielzahl von plastidären Transkripten zwei unterschiedliche 5'-Enden auf. Diese entstehen durch Transkriptionsinitiation und anschließenden exonukleolytischen Abbau oder durch endonukleolytische Spaltung im intercistronischen Bereich und anschließende exonukleolytische Degradation des nun freien 5'-Endes (Monde *et al.* 2000). Die 5'-3'-Exonukleaseaktivität ist eine Besonderheit plastidärer Exoribonukleasen, sie fehlt in Prokaryoten und ist neben der spezifischen Prozessierung von 5'-Enden auch an der allgemeine Degradation plastidärer Transkripte beteiligt (Drager *et al.* 1999).

Die 5'-Prozessierung ist entscheidend für die Translation der meisten Transkripte. So konnte für die Transkripte *ndhD* aus Tabak, *rbcL* aus Gerste und *petD* aus Mais, so wie für zahlreiche plastidäre Transkripte aus *C. reinhardtii*, gezeigt werden, dass die längere bzw. nicht vollständig prozessierte Form überhaupt nicht oder allenfalls auf einem sehr niedrigen Niveau translatiert wird (Monde *et al.* 2000).

Daneben existieren eine Vielzahl nukleär kodierter Faktoren, die spezifisch an die 5'-untranslatierten Regionen von mRNAs binden und so Einfluss auf die Prozessierung, Stabilisierung und/oder Translation des jeweiligen Transkriptes nehmen. Biochemisch konnte in Spinat und *C. reinhardtii* eine Reihe von Proteinen identifiziert werden, die lichtabhängig als Komplex an die 5'-untranslatierte Region der *psbA*-mRNA binden (Danon and Mayfield 1991; Bruick and Mayfield 1999). Die Gene für zwei dieser nukleär kodierten Proteine, RB47 und RB60, konnten kloniert werden. RB47 zeigt große Ähnlichkeiten zu Poly A-bindenden Proteinen des Cytosols, besitzt RNA-Bindeaktivität und ist essentiell für die Translation der *psbA*-RNA (Yohn *et al.* 1996; Yohn *et al.* 1998). Bei dem zweiten identifizierten Protein RB60 handelt es sich um eine Protein-Disulfidisomerase, die wahrscheinlich in die lichtabhängige bzw. Redox-abhängige Regulation der RNA-Bindeaktivität von RB47 involviert ist (Trebitch *et al.* 2000; Trebitsh and Danon 2001).

Über genetische Ansätze in *A. thaliana*, Mais (*Zea mays*) und *C. reinhardtii* konnten weitere nukleäre Faktoren identifiziert werden, die über direkte oder indirekte Interaktion mit dem 5'-untranslatierten Bereich an der Prozessierung, Stabilisierung und/oder Translation spezifischer plastidärer Transkripte beteiligt sind. Die genaue Funktion dieser Faktoren kann jedoch meist nur aus dem Phänotyp entsprechender Mutanten abgeleitet werden (Monde *et al.* 2000; Zerges 2000). So sind z.B. die Mutanten *nac2-26*, *mcd-1* und *mbb1(222E)* aus *C. reinhardtii* spezifisch in der Akkumulation der 5'-prozessierten *psbD*, *petD* oder *psbB*-Transkripte gestört (Nickelsen *et al.* 1994; Drager *et al.* 1998; Boudreau *et al.* 2000; Vaistij *et*

al. 2000a; Vaistij *et al.* 2000b). Folglich sind die Gene *Nac2*, *Mcd-1* und *Mbb1*, bzw. deren Genprodukte für die Stabilität dieser Transkripte essentiell und binden vermutlich direkt oder indirekt über weitere Protein an die Cis-Determinanten der zugehörigen 5'-untranslatierten Regionen. Ähnliches gilt für die Gene *Tbc1*, *Tbc2* und *Tbc3*, für deren Genprodukte ein direkter Zusammenhang zwischen Bindung der untranslatierten Region und Translation der *psbC*-mRNA postuliert wird (Auchincloss *et al.* 2002).

Daneben existieren jedoch auch Mutanten, die in der Prozessierung/Stabilität mehrerer Transkripte betroffen sind. So ist die bereits oben erwähnte Mutante *mbb1/222E* neben dem Defekt bezüglich der *psbB*-RNA auch in der Prozessierung und Akkumulation der *psbH*-RNA betroffen (Vaistij *et al.* 2000). Gleiches gilt die Mutante *crp1* aus Mais, die Defekte in der Prozessierung und Translation der *petD*- und unabhängig davon auch in der Translation der *petA*-RNA aufweist. Somit ist das in der Mutante betroffene Gen *CRP1* bzw. dessen Genprodukt für die Ausübung zweier unabhängiger Funktionen essentiell (Barkan *et al.* 1994; Fisk *et al.* 1999).

Eine weitere Regulationsmöglichkeit der plastidären Genexpression auf posttranskriptioneller Ebene ergibt sich aus der Tatsache, dass eine nicht geringe Anzahl plastidärer Gene Introns besitzen, die vor der Translation posttranskriptional herausgespleißt werden müssen. Diese Introns gehören aufgrund ihrer strukturellen und katalytischen Eigenschaften alle der Gruppe I und II an (Mayfield *et al.* 1995). Obwohl es in beiden Gruppen Mitglieder gibt, die *in vitro* unter nicht-physiologischen Bedingungen autokatalytisches Spleißen zeigen, geht man davon aus, dass *in vivo* zusätzliche nukleär kodierte Faktoren für den Spleißvorgang benötigt werden. So konnten in *C. reinhardtii* bereits mehrere Gene identifiziert werden, die am Spleißen von Gruppe I Introns des *psbA*-Gens und der 23S rRNA beteiligt sind (Herrin *et al.* 1990; Holloway and Herrin 1998; Li *et al.* 2002).

Daneben konnten auch in Landpflanzen bereits nukleäre Gene identifiziert werden, die für das Spleißen von Gruppe II-Introns benötigt werden (Vogel *et al.* 1999). So ist die Maismutante *crs1* spezifisch im Spleißen des Gruppe II-*atpF*-Introns gestört (Jenkins *et al.* 1997). Daneben zeigt die Maismutante *crs2* einen Defekt im Spleißen mehrerer Gruppe II-Introns verschiedener plastidärer Transkripte (Jenkins *et al.* 1997; Vogel *et al.* 1999). Die in den Mutanten betroffenen Gene konnten bereits isoliert werden. *Crs1* kodiert ein stark basisches Protein, ohne Homologien zu bereits bekannten Proteinen und bildet eine neue eigenständige Gruppe von Gruppe II-Intron-Spleißfaktoren, die möglicherweise durch Duplikation primitiver Vorläufergene unbekannter Funktion entstanden sind (Till *et al.* 2001). Das Gen *Crs2* kodiert ein Protein mit Ähnlichkeiten zur t-RNA-Peptidyl-Hydrolyase aus Bakterien, besitzt jedoch keine Enzymaktivität (Jenkins and Barkan 2001).

Als letzte posttranskriptionelle Modifikation ist die RNA-Edierung zu nennen. Bei der RNA-Edierung erfolgt der Basenaustausch Cytosin gegen Uracil, in einigen Fällen auch umgekehrt, an einer streng definierten Position der mRNA (Sugiura *et al.* 1998; Bock 2000). Im Plastom höherer Pflanzen sind insgesamt etwa 30 Edierungsstellen bekannt. Hauptsächlich dient die Edierung zum Erhalt funktioneller Aminosäurereste, wie im Falle der Transkripte *rpoA* in Tabak und *ndhA* in Mais (Maier *et al.* 1992; Hirose *et al.* 1999). Daneben führt die Edierung auch zur Erzeugung neuer Start- oder Stop-Codons, wie im Falle der Transkripte *psbL* und *ndhD* (Kudla *et al.* 1992; Hirose and Sugiura 1997). Der genaue Mechanismus der Edierung ist noch weitgehend unbekannt. Feststeht jedoch, dass auch hier nukleär kodierte Faktoren eine entscheidende Rolle spielen (Zeltz *et al.* 1993; Karcher and Bock 1998). Des Weiteren konnten *in vitro* zahlreiche Proteine aus Tabak und Erbse nachgewiesen werden, die spezifisch an die Cis-Elemente von Edierungsstellen binden (Hirose and Sugiura 2001; Miyamoto *et al.* 2002; Miyamoto *et al.* 2004).

Die Differenzierung der Proplastide zum Chloroplasten erfordert ebenso den koordinierten Ablauf der posttranslationalen Prozesse. Das heißt im Anschluss an die Translation, bzw. dem Import nukleär kodierter Proteine über die Import-Komplexe der inneren und äußeren Hüllmembran, müssen die synthetisierten Polypeptide zunächst an ihre jeweiligen Bestimmungsorte innerhalb der Plastide transportiert werden.

Der Transport von Proteinen in das Thylakoidlumen des Chloroplasten folgt dabei über zwei unterschiedliche Hauptwege, einem Δ pH-abhängigen Tat-(twin-arginine-translocase)-Transportweg und über den bakterienhomologen ATP-abhängigen SecA/SecY-Komplex (Robinson *et al.* 2000; Robinson and Bolhuis 2001). Die Information für den zielgerichteten Transport und die Wahl des Transportweges ist dabei in der Transitsequenz luminaler Proteine enthalten.

Integrale Membranproteine werden hingegen weitgehend über einen GTP-abhängigen SRP-(signal recognition particle)-Mechanismus in die Thylakoidmembran eingefügt, dessen beteiligten Stroma-Komponenten starke Homologien zum SRP-Mechanismus aus Bakterien aufweisen (Robinson *et al.* 2000). Da die meisten integralen Membranproteine keine Präsequenz für die Integration in die Thylakoidmembran aufweisen, muss die Information für die zielgerichtete Integration im reifen Protein enthalten sein (Lamppa 1988; Robinson *et al.* 2000). Eine weitere Gruppe thylakoider Membranproteine inseriert vermutlich spontan und unabhängig von allen bekannten Transportmechanismen in die Thylakoidmembran (Kim *et al.* 1998; Kim *et al.* 1999; Robinson *et al.* 2000; Mant *et al.* 2001).

Schließlich werden viele Proteine vor oder nach dem Transport zum Zielort noch weiteren Modifikationen, wie z.B. den Einbau von Co-Faktoren oder spezifische Faltungen,

unterzogen und gegebenenfalls koordiniert zu Proteinkomplexen assembliert. Auch an diesen Prozessen sind wiederum nukleär kodierte Biogenese- und Assemblierungsfaktoren beteiligt (Meurer *et al.* 1998; Lennartz *et al.* 2001; Plücken *et al.* 2002).

2. Die Mutante *hcf107* aus *Arabidopsis thaliana*

Eine Möglichkeit, die Regulation der plastidären Genexpression weitergehend zu untersuchen ist die Arbeit mit *hcf*-(high chlorophyll fluorescence)-Mutanten (Felder *et al.* 2001; Kroll *et al.* 2001; Lennartz *et al.* 2001; Plücken *et al.* 2002; Meierhoff *et al.* 2003). Diese, durch T-DNA- oder EMS-Mutagenese erzeugten, Mutanten weisen eine erhöhte Chlorophyllgrundfluoreszenz auf. Dies ist ein Zeichen dafür, dass in der entsprechenden Mutante eine Störung des photosynthetischen Elektronentransportes vorliegt und deutet wiederum auf einen Defekt in der Chloroplastbiogenese der Mutante hin (Miles 1982; Miles 1994). Mit Hilfe von spektroskopischen Untersuchungen ist des Weiteren eine direkte Unterscheidung zwischen *hcf*-Mutanten, die spezifisch im Aufbau eines der photosynthetisch aktiven Proteinkomplexe betroffen sind, und *hcf*-Mutanten mit einer pleiotropen Schädigung möglich (Meurer *et al.* 1996a).

Mit Hilfe der Mutante *hcf107* aus *Arabidopsis thaliana* können möglicherweise neue Einblicke in die Regulation der plastidären Genexpression durch nukleär kodierte Faktoren gewonnen werden. Diese Mutante wird repräsentiert durch zwei Allele *hcf107-1* (Meurer *et al.* 1996a) und *hcf107-2* (Felder *et al.* 2001). Die Mutante zeigt die für *hcf*-Mutanten typische erhöhte Chlorophyllfluoreszenz und besitzt keine variable Fluoreszenz mehr (Meurer *et al.* 1996a). Letzteres weist auf einen Defekt im Photosystem II hin, der sich auf Proteinebene widerspiegelt (Meurer *et al.* 1998). So findet keine Synthese der Photosystem II-Untereinheiten CP47 (PsbB) und PsbH statt. Zusätzlich sind die Proteinspiegel der PS II-Untereinheiten D1 (PsbA), D2 (PsbD) und CP43 (PsbC) zum Teil drastisch reduziert. Auf RNA-Ebene zeigt die Mutante eine Störung im Transkript-Muster des plastidären *psbB*-Operons (Felder *et al.* 2001).

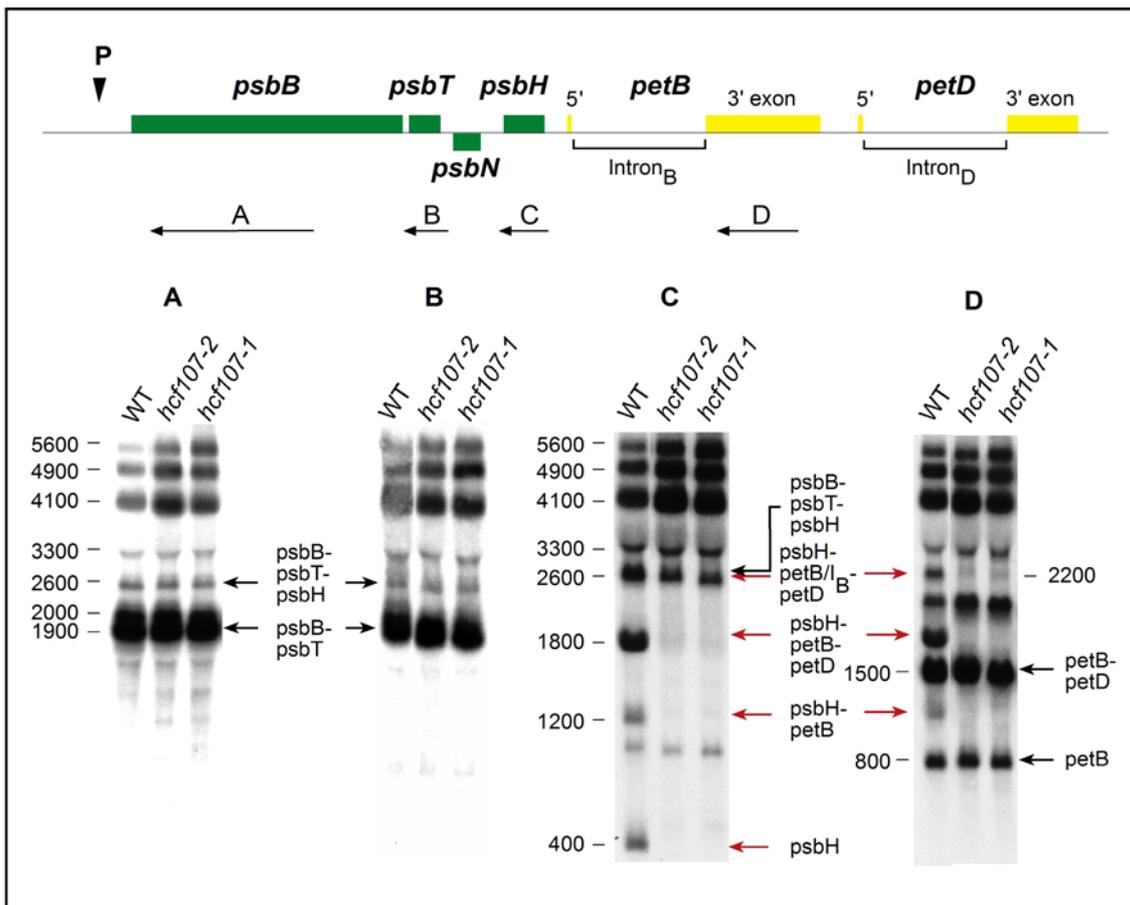


Abb. 1: Die nukleäre Mutante *hcf107* zeigt Störungen im Transkriptmuster des plastidären *psbB*-Operon (aus Felder *et al.* 2001). Acht Mikrogramm Gesamt-Blatt-RNA aus drei Wochen-alten Mutanten bzw. Wildtyp-Pflanzen (WT) wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und mittels Northern-Hybridisierung analysiert ([A] bis [D]). Die verwendeten Sonden und ihre Lokalisation sind durch Pfeile und Buchstaben gekennzeichnet. (A bis D). Die Größe (in Nucleotiden) und Zusammensetzung der Transkripte ist angegeben. Die in den Mutanten fehlenden Transkripte sind mit roten Pfeilen gekennzeichnet.

Das *psbB*-Operon umfasst sowohl Gene, die für Untereinheiten des Photosystems II als auch des Cytochrom b_6f -Komplexes kodieren, und zeigt somit den typischen heterogenen polycistronischen Aufbau einer plastidären Transkriptionseinheit (Douglas 1994). Die Transkription erfolgt ausgehend von einem einzelnen Promotor mit prokaryotischen Aufbau und führt aufgrund zahlreicher Prozessierungsschritte zu einem komplexen RNA-Muster (Abb. 1). Ausgehend von einem langen Primärtranskript entstehen im ersten Schritt durch endonukleolytische Spaltungen tri- und dicistronische Transkripte, die anschließend in monocistronische Transkripte gespalten werden können. So entstehen eine dicistronische *psbB-psbT*-RNA und monocistronische *psbH*-, *petB*- und *petD*-Transkripte (Barkan 1988; Westhoff and Herrmann 1988; Felder *et al.* 2001). Im Laufe der Prozessierung wird ein Teil der Transkripte an den 5'- (*psbB*, *psbH*) und 3'-Enden (*psbT*, *petD*) exo- bzw. endonukleoytisch geschnitten und die Introns der Gene *petB* und *petD* herausgespleißt. Trotz genauer Kenntnis der einzelnen Prozessierungsschritte lässt sich kein festgelegter

Ablauf der Vorgänge erkennen. Vielmehr scheint es sich größtenteils um einen statistischen Prozess zu handeln (Westhoff and Herrmann 1988).

Der Defekt in der Mutante *hcf107* manifestiert sich in dem Fehlen aller 5'-prozessierten *psbH*-Transkripte, der monocistronischen *psbH*-, der dicistronischen *psbH-petB*-RNA und der tricistronischen *psbH-petB-petD*-RNAs (Abb. 1). Da die Prozessierung der 5'-UTRs für die Translation der *psbH*-RNA Voraussetzung ist, findet in der Mutante keine PsbH-Synthese statt (Felder *et al.* 2001). PsbB wird unter normalen Bedingungen ebenfalls nicht synthetisiert, obwohl in der Mutante alle *psbB*-Transkripte auf Wildtyp-Niveau akkumulieren. Trotzdem erfolgt unter normalen Bedingungen keine Translation der *psbB*-RNA (Felder *et al.* 2001). Nur unter Schwachlichtbedingungen findet in einem geringen Umfang die Synthese des Proteins statt (Plücken *et al.* 2002). Folglich hat das in der Mutante betroffene Gen bzw. Genprodukt eine wichtige Funktion in der Prozessierung und/oder Stabilisierung translationskompetenter *psbH*-Transkripte bzw. deren Translation. Daneben ist es essentiell für die Translation der *psbB*-RNAs bzw. PsbB-Synthese.

Das Gen *HCF107* wurde mittels markergestützter Positionsklonierung isoliert (Sane *et al.* 2004, Manuskript in Vorbereitung). Es besteht aus einem 1956 Nukleotide umfassenden Leseraster, das durch 7 Introns unterbrochen ist (Abb. 2). Das abgeleitete Polypeptid umfasst 652 Aminosäuren. Dabei zeigen die ersten 68 Aminosäuren die typischen Eigenschaften für eine plastidäre Transitsequenz, wie z.B. serinreiche Abschnitte und Bereiche mit unpolaren Aminosäuren am N-Terminus. Eine weitere charakteristische Eigenschaft des Proteins sind elf tandemartig angeordnete TPR-Motive von Aminosäure 168 bis 545 (Abb. 2). Der Begriff TPR steht für tetratricopeptide repeat, einem sich wiederholenden, auf Primärsequenz degenerierten, Sequenzmotiv aus jeweils 34 Aminosäuren. Im Allgemeinen treten diese TPRs in Gruppen von 3-16, oft in tandemartiger Anordnung, auf (Blatch and Lässle 1999). Dabei bildet jedes TPR-Motif zwei antiparallele α -Helices (Abb. 2). Die Gesamtheit der TPR-Domäne stellt eine rechtshändige superhelikale Struktur aus gestapelten α -Helices dar. Das Innere dieser Helix bildet wiederum einen amphipatischen Kanal, über den vermutlich Wechselwirkungen mit anderen Proteinen übertragen werden (Das *et al.* 1998).

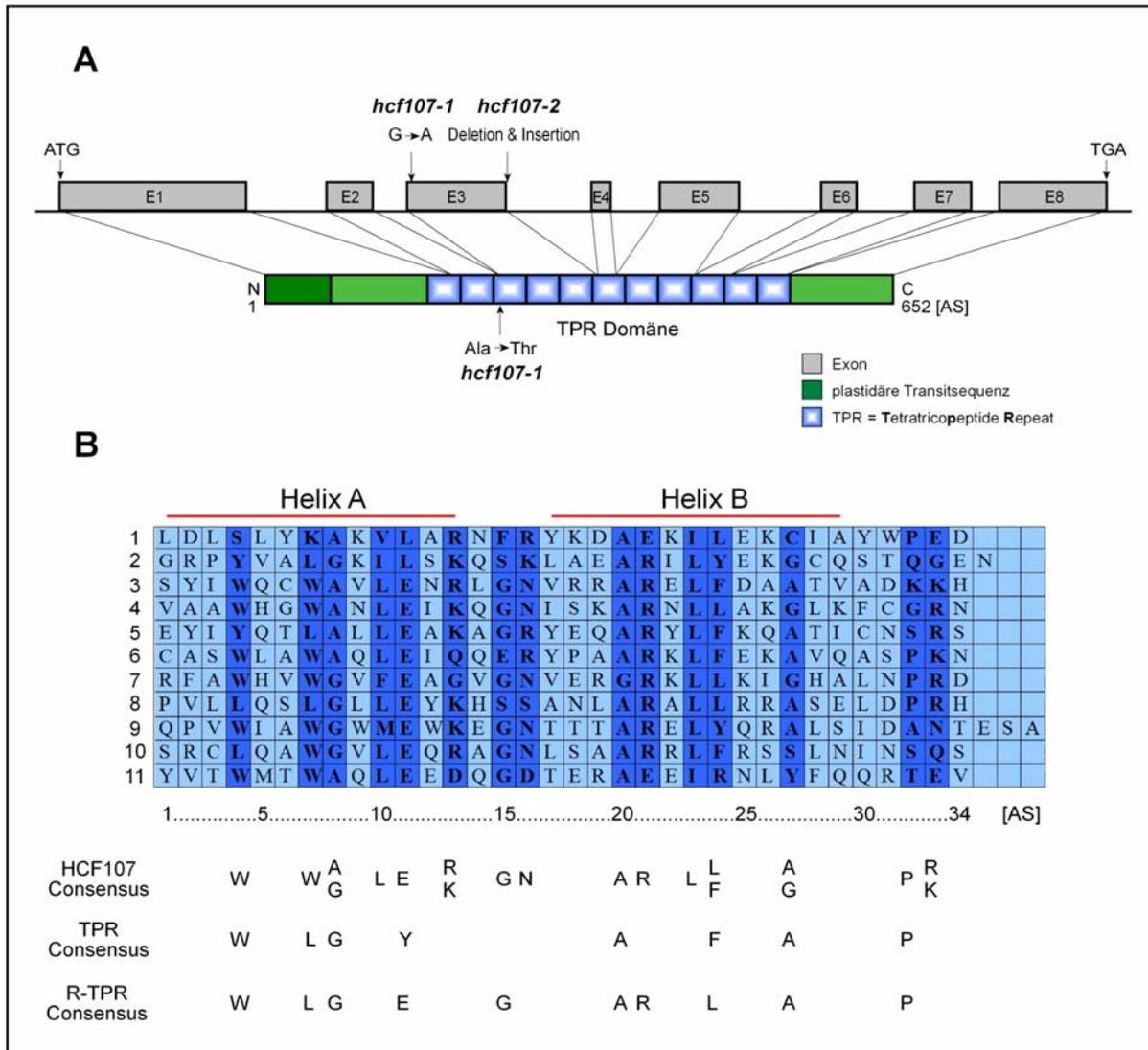


Abb. 2: Das nukleäre Gen *HCF107* aus *A. thaliana* kodiert ein TPR-Protein mit plastidärer Lokalisationssequenz. (A) Grafische Darstellung der Exon-/Intronstruktur und der korrespondierenden Proteinsequenz des 3.2 kb umfassenden Gens *HCF107*. Die in den Mutanten *hcf107-1* und *hcf107-2* vorliegenden Mutationen sind angegeben. Die mutmaßliche plastidäre Transitsequenz sowie die 11 tandemartig angeordneten TPR-Motive des 652 Aminosäuren (AS) großen Polypeptids sind gekennzeichnet. **(B)** Sequenzvergleich der 11 TPR-Motive des Proteins HCF107. Aminosäurepositionen, die in wenigstens 5 der 11 TPR-Motive konserviert sind, sind dunkel unterlegt. Der Bereich der Helices ist durch rote Balken gekennzeichnet. Des Weiteren ist die Konsensussequenz der TPR-Motive in HCF107 im Vergleich zur allgemeinen TPR- und R-TPR-Konsensussequenzen angegeben.

Proteine mit TPR-Domänen zeigen eine weite Verbreitung. Man findet sie in einer Vielzahl von Organismen, darunter Bakterien, Cyanobakterien, Pilze, Pflanzen, Insekten und Säugetiere, mit den unterschiedlichsten Funktionen und subzellulärer Lokalisation, häufig auch als Bestandteile höhermolekularer Proteinkomplexe (Blatch and Lässle 1999). Die Primärsequenz der 11 TPR-Motive im Protein HCF107 weist jedoch Abweichungen zur klassischen Konsensussequenz der meisten bekannten TPR-Proteine auf (Sane *et al.* 2004,

Manuskript in Vorbereitung). So ist das hoch konservierte Tyrosin an Position 11 durch einen Glutamat-Rest ersetzt. Weitere Besonderheiten in der Consensussequenz sind die Aminosäure Glycin an Position 15, ein Arginin an Position 21 und die Aminosäure Leucin an Position 24 der TPR (Abb. 2). Diese Besonderheiten findet man auch bei anderen plastidären, an der 5'-Prozessierung/Stabilisierung bzw. Translation plastidärer Transkripte beteiligten TPR-Proteine wie Nac2 (Boudreau *et al.* 2000) und dem zu HCF107 orthologen Protein Mbb1 aus *C. reinhardtii* (Vaistij *et al.* 2000b). Diese speziellen Eigenschaften der Consensussequenz wurden von (Ben-Yehuda *et al.* 2000) als R-TPR (RNA-TPR) beschrieben. Danach handelt es sich hierbei um eine Subklasse der TPR-Proteinfamilie, deren Mitglieder alle an RNA-Prozessierungsschritte involviert sind und direkt oder indirekt mit RNA interagieren, jedoch wie HCF107 keine der bekannten RNA-Bindedomänen aufweisen.

3. Ziele dieser Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollten mit Hilfe der Mutante *hcf107* aus *A. thaliana* neue Einblicke in die posttranskriptionellen Regulationsmechanismen der plastidären Genexpression gewonnen werden. Das von der Mutation betroffene Gen *HCF107* wurde bereits mittels markergestützter Positionsklonierung isoliert (Sane *et al.*, eingereichtes Manuskript). Daher sollte zunächst die cDNA des Gens *HCF107* isoliert, und ihre Identität mittels Northernanalyse und Komplementationsstudien verifiziert werden. Des Weiteren sollte im Laufe der Arbeit die funktionelle Analyse des Gens *HCF107* durchgeführt werden. Hierzu wurde der Ansatz der "in vivo"-Etikettierung verfolgt. Dieser Ansatz beruht auf der Komplementation der Mutante mit einer Epitop-markierten Version des Proteins. Unter Verwendung des angefügten Epitops sollte in Folge mit Hilfe von Immunolokalisierungssexperimenten der Wirkort des HCF107 Proteins innerhalb des Chloroplasten ermittelt werden. Anschließend sollte unter Anwendung biochemischer Methoden die Aufreinigung der HCF107-Fusionsproteine und möglicher interagierender Komponenten erfolgen.

II. Material und Methoden

1. Material

1.1 Chemikalien und Enzyme

Die verwendeten Chemikalien besaßen p.a.-Qualität und wurden, falls nicht anders vermerkt, von den Firmen Baker (Deventer, Niederlande), Difco Laboratorie (Detroit, USA), Invitrogen Life Technologies (Karlsruhe), Janssen (Beerse, Belgien), Merck (Darmstadt), Riedel-de-Haen (Seelze), Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (München) bezogen. Enzyme und Reagenziensätze wurden von den Firmen Roche (Mannheim) und MBI Fermentas (St. Leon-Rot) geliefert. Die verwendeten radioaktiven Nukleotide sowie Nylon-Membranen (Hybond N) wurden von Amersham Biosciences (Uppsala, Schweden) bezogen, Nitrocellulose-Membranen von Schleicher & Schuell (Dassel). Die Röntgenfilme "Kodak Scientific Imaging Film X-OMAT AR" wurden von Kodak (Rochester, USA) erworben. Das Herbizid Basta stellte freundlicherweise die Fa. Hoechst (Frankfurt) zur Verfügung.

1.2 Saatgut

Die Mutanten *hcf107-2* (Felder *et al.* 2001), *hcf152-1* (Meierhoff *et al.* 2003) und *hcf155* (Kroll *et al.* 2001) entstammen einer Sammlung von T-DNA-Insertionslinien, die von Nicole Bechthold (Institute Nationale de la Recherche Agronomique, Versailles) zur Verfügung gestellt wurde (Bechthold *et al.* 1993). Die Mutanten *hcf107-1* wurde aus einer EMS-Mutagenesepopulation isoliert (Meurer *et al.* 1996a).

Für die Untersuchungen wurde Saatgut der F2- oder F3-Generation aus Kreuzung der T3- bzw. M3-Generation mit Wildtyp-Pflanzen der Ökotypen Columbia und Landsberg erecta verwendet. Dieses wurde freundlicherweise von Karin Meierhoff (Düsseldorf), Daniela Kroll (Düsseldorf) und Anil P. Sane (Lucknow, Indien) zur Verfügung gestellt.

1.3. Bakterienstämme und Plasmide

Es wurden folgende Bakterienstämme verwendet:

Escherichia coli, DH5 α : deoR, endA1, gyrA96, hsdR17($r_k^- m_k^+$), recA1, relA1, supE44, thi-1, F⁻, λ^- , Δ (lacZYA-argFV169), Φ 80 δ lacZ Δ M15 (Bethesda Res. Lab., 1986)

Escherichia coli, SCS110: rpsL (Str^r), thr, leu, endA, thi-1, lacY, galK, galT, ara, tonA, tsx, dam, dcm, supE44D (lac-proAB), [F['], traD36, proAB, lacI^qZ Δ M15] (Stratagene, Heidelberg)

Agrobacterium tumefaciens, GV3101: pMP90RK (Koncz *et al.*, 1994)

Für Standard-Klonierungen wurde der Vektor pBlueskript KSII+ (Stratagene Heidelberg) verwendet. Zur Herstellung von Protein A- und Hämagglutinin-Fusionskonstrukten wurden die Plasmide pBS-ProA2-2 und pBSHA2 eingesetzt. Diese wurden wie das Plasmid pPCV91-155PA von Daniela Kroll (Düsseldorf) und Katja Lennartz (Düsseldorf) zur Verfügung gestellt.

Für die Klonierung in *Agrobacterium tumefaciens* zur späteren agrobakterienvermittelten Blütentransformation von *Arabidopsis*-Pflanzen wurden die Plasmide pPCV91 (Strizhov *et al.*, 1996) und pPEX001 (B. Reis, MPIZ Köln) verwendet.

1.4 Antiseren

Antigen/Spezies	Hersteller/Referenz
PS I-A/B (PsaA/B) / Spinat	K. Apel, ETH, Zürich, Schweiz
PS I-D (PsaD) / Spinat	R.Nechushtai, Hebrew-University- Jerusalem, Israel
Cyt b ₆ (PetB) / Spinat	A. Barkan, University of Oregon, USA
PS II-D1 (PsbA) / Gerste	J. Mullet, Texas A&M University, USA
PS II-CP47 (PsbB) / Spinat	U. Johannigmeier, Universität Halle
CF ₁ α (AtpA) / Spinat	N. Nelson, Universität Tel Aviv, Israel
Rubisco-L (RbcL) / Spinat	P. Westhoff, Universität Düsseldorf

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Antiseren.

1.5 Oligonukleotide

	Sequenz (5' → 3')	Verwendungszweck
PCV91-H	GGAGAGGACCTCGAGCTGCAG	Sequenzierung
PCV91-R	GCTCAACACATGAGCGAAACC	Sequenzierung
44F-Bcl	TTTTCATGATCATCATTCTTCTCCCGAG	pPCV91-107
Gen1F-Bcl	CTTTAAATTGATCATCGACCCTTCATC	pPCV91-107
ProA-BclIH	CAGCCTCGAGTGATCACTAGTGGCGCCCTGCAGGTCGACC ATGGATCCGAGAATCTTTATTTTCAGGGATCC	pBS-ProA2-2
ProA-BclIR	ATTTAGTCTAGATGATCACTAAAGAGCCGCGGAATTCGCA	pBS-ProA2-2
At107-SpeIH	GCGGACTAGTATGCACTTCTTCTCGTGCCG	pPEX-107PA, pPEX-107-HA
At107-NcoIR	CGCCTCCATGGGCACCATTATTCTTCTCTAGTG	pPEX-107PA, pPEX-107-HA
At155-SpeIH	GCGGACTAGTATGGCTCTCAAAGCTTCACC	pPCV91-155PA
At155-NcoIR	CGCCTCCATGGAAGTCGTTAGCTTTCCTTCGC	pPCV91-155PA
F11F8H	TGTGATTCCCATGGATGCAAGTCC	Genotypisierung <i>hcf152-1</i>
F11F8LB	CTGAATGAAGTATGCG	Genotypisierung <i>hcf152-1</i>
At155-RB3	CTTGAAGCTATCACTGAGATGCACC	Genotypisierung <i>hcf155</i>
COD-LB4rev	GTTCTGAGAGGGAGAATCCTGAGG	Genotypisierung <i>hcf155</i>
LBTaq 14	GGTAATAGGACACTGGGATTCGTC	Genotypisierung <i>hcf152-1/hcf155</i>
WtF	TGGTAAGTGTGTTGTATC	Genotypisierung <i>hcf107</i>
MutF	TTGGTTGGTTGGTTGGTT	Genotypisierung <i>hcf107</i>
Rev	TACTTCAGCTTCAAACAC	Genotypisierung <i>hcf107</i>
psbB-H	ACTGTTGTATTGAATGATCCCGG	RT-PCR
psbB-R	ACCTTCCCGTTAGCCATAAGG	RT-PCR
psbH-H	GAATACAAAATAAGATTTATGGC	RT-PCR
psbH-R	AATACCGCAAATAGAGCCATTGC	RT-PCR
petB-H	GTCTTGAGATTCAGGCGATTGC	RT-PCR
petB-R	GACCATCGATGAACTGATCGG	RT-PCR
petD-H	GAATGATCCTGTATTACGAGC	RT-PCR
petD-R	TACGGTTAATAATCCCCTGG	RT-PCR
psbE-H	AGCACAGGAGAACGTTCTTTTGC	RT-PCR
psbE-R	TATTAATGGAATGCCTTGTCGGC	RT-PCR
psbA-H	GACTGCAATTTTAGAGAGACGCG	RT-PCR
psbA-R	GCATAAGAATGTTGTGCTCAGCC	RT-PCR
psbD-H	CTATAGCCCTTGGTAAATTTACC	RT-PCR
psbD-R	TATGAAACCTTGGAAAAAGAGG	RT-PCR

Tabelle 2: Liste der verwendeten Oligonukleotide. Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Invitrogen Life Technologies (Karlsruhe) bezogen.

2. Pflanzenanzucht und Selektion von *hcf*-Mutanten

Für die sterile Anzucht wurden *Arabidopsis*-Samen in 30% (v/v) Klorix (Colgate-Palmolive GmbH, Hamburg) und 0.02% (v/v) Triton oberflächensterilisiert und auf 1/2 MS-Medium [1% (w/v) Saccharose, 2.5 mM MES/NaOH (pH 5.7), 2.35 g/l MS-Salze, 0.3 % (w/v) Gelrite] in Petrischalen (\varnothing 10 cm) ausgesät (Murashige and Skoog 1962). Die Anzucht der Pflanzen erfolgte in einem Anzuchtschrank bei 23°C, bei einer Beleuchtung von 50-70 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$ (Lumilux L36W/11-Tageslichtröhren, Osram, Berlin) und einem Licht/Dunkel-Rhythmus von 16h/8h. Für die Anzucht auf Erde wurde Floraton I-Komposterde (Floragard, Oldenburg) als Substrat verwendet. Sie erfolgte in einer Klimakammer bei 23°C, einem Licht/Dunkel-Rhythmus von 16h/8h und einer Lichtintensität von 80 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$ (Leuchtstoffröhren Fluora L58W/77 und Natura da Luxe L58W/76, Osram, Berlin). Zur Synchronisation der Keimung wurden die Aussaaten zuvor für 48 h bei 4 °C im Kaltraum belassen. Für die Saatgutgewinnung wurde das Aracon-System der Firma Beta Tech (Gent, Belgium) verwendet. Die Selektion von Mutanten mit *hcf*-Phänotyp erfolgte nach ca. 14 Tagen durch Sichtung steriler Aussaaten mit einer UV-Handlampe (Fluotest Forte 180 W, Heraeus, Hanau).

3. Chlorophyll-Fluoreszenz-Induktionsmessungen

Die Chlorophyll-Fluoreszenz drei Wochen alter, steril angezogener *Arabidopsis*-Pflanzen wurde mittels des Pulsamplituden-modulierten Fluorometers PAM 101/103 (FL 101, 101 ED, 101 F, Walz, Effeltrich) gemessen (Schreiber 1986; Schreiber *et al.* 1986; Krause and Weis 1991). Die Auswertung der Fluoreszenzmessung erfolgte nach der Nomenklatur von van Kooten und Snel (van Kooten and Snel 1990). Vor der Messung wurde die entsprechende Pflanze 5 Minuten unter der Faseroptik vorverdunkelt. Gepulstes Messlicht [Taktfrequenz 1.6 kHz, 1 μs Pulslänge, Photonenflußdichte PFD1 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$, Peakwellenlänge 650 nm] diente zur Anregung der Grundfluoreszenz F_0 . Die maximale Fluoreszenz F_m wurde durch einen sättigenden Weißlichtimpuls [PFD > 6000 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$, Pulsdauer 1 s] bestimmt. Anhand der Messwerte wurde wiederum die variable Fluoreszenz $F_v = F_m - F_0$ und das Verhältnis F_v/F_m ermittelt. Zur Anregung der Photosynthese wurde aktinisches Licht [PFD 130 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$] verwendet. Dabei wurde über einen Zeitraum von 3-5 Minuten die Abnahme der Fluoreszenz bis zur Einstellung des photosynthetischen Fließgleichgewichtes F_s verfolgt. Durch einen erneuten sättigenden Weißlichtimpuls während der Belichtungsphase konnten wiederum die photochemische Fluoreszenzlöschung [$qP = (F_m' - F_s)/(F_m' - F_0)$], die nicht-photochemische Fluoreszenzlöschung [$qN = 1 - (F_m' - F_0)/(F_m - F_0)$] und die Quantenausbeute des Photosystems II [$\Phi_{II} = (F_m' - F_s)/F_m'$] bestimmt werden (Schreiber 1986; Genty *et al.* 1989).

4. Transformation von *Agrobacterium tumefaciens*

Elektrokompetente Agrobakterien des Stammes *A. tumefaciens* GV3101 pMP90RK (Koncz *et al.* 1994) wurden mit 50-100 ng Plasmid-DNA durch Elektroporation im Electro Cell Manipulator 600 (ITC Biotechnology, Heidelberg) nach Herstellerangaben transformiert. Zur Anzucht und Selektion positiver Klone wurde YEB-Medium [5 g/l Fleischextrakt, 1 g/l Hefe-Extrakt, 5 g/l Pepton, 5g/l Saccharose, 2 mM MgCl₂] mit Antibiotikazusatz [100 µg/l Rifampicin, 100 µg/ml Carbenicillin, 25 µg/ml] verwendet. Zur Kontrolle der Transformation wurde die Plasmid-DNA der selektierten Klone mittels alkalischer Lyse (Birnboim and Doly 1979) isoliert und mit Hilfe von Restriktionsanalysen auf ihre Intaktheit überprüft.

5. Transformation von *Arabidopsis thaliana*

Die Agrobakterien-vermittelte Blütentransformation von *A. thaliana* erfolgte nach dem Protokoll von Clough und Bent (Clough and Bent 1998). Da homozygote *hcf*-Mutanten auf Erde letal sind wurden nur heterozygote Pflanzen für die Transformation verwendet.

Zunächst wurden 20 - 30 Pflanzen bis zur Blütenbildung auf Erde angezogen. Dann wurden 5-6 Tage vor der Transformation die primären Blütentriebe entfernt. Dies ermöglicht ein Austreiben der zahlreichen sekundären Blütentriebe und erhöht somit die Zahl der zu transformierenden Blüten. Zur Vorbereitung wurden die Agrobakterien ausgehend von einer Einzelkolonie in 10 ml YEB-Medium [100 µg/l Rifampicin, 100 µg/ml Carbenicillin, 25 µg/ml] über Nacht bei 28 °C angezogen. Am nächsten Morgen wurde die Über-Nachtkultur in 500 ml frisches YEB Medium überimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0.8 bei 28 °C inkubiert. Im Anschluss wurden die Agrobakterien für 10 Minuten bei 7000 UpM (GSA-Rotor, Sorvall-Zentrifuge) und Raumtemperatur sedimentiert. Die Agrobakterien wurden in 500 ml 1 % (w/v) Saccharose resuspendiert und unmittelbar vor der Transformation mit 250 µl Silwet L-77 [0.05 % (v/v) Endkonzentration] versetzt. Zur Transformation wurde dann der vollständige oberirdische Teil der Pflanzen ein bis zwei Sekunden in die Agrobakterien-Lösung eingetaucht. Die so behandelten Pflanzen wurden zunächst für 24 Stunden mit einer Plastikhaube oder -folie abgedeckt, um eine erhöhte Luftfeuchtigkeit zu gewährleisten und dann weiter unter Standardbedingungen bis zur Saatgutreife angezogen. Die reifen Samen wurde sterilisiert und zur Selektion von Transformanten auf 1/2 MS-Medium mit 20 µg/ml Hygromycin (pPCV91) oder 10 µg/ml Phosphinotricin (pPEX001) ausgesät. DNA von potentiellen Transformanten wurde mittels PCR auf die Anwesenheit des eingebrachten Komplementationskonstruktes getestet, und unter Verwendung von PCR-Markern der Genotyp der Transformanten bestimmt.

6. Computergestützte Sequenzanalysen

Die computergestützte Sequenzanalyse von Nukleotid- und Protein-Sequenzen, wie die Restriktionsanalyse, die Leseraster-Erkennung und -Übersetzung, als auch die Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung und Hydropathieberechnung, wurden mit Hilfe des Programms MacMolly Tetra (SoftGene GmbH; Schöneberg *et al.*) vorgenommen. Datenbankrecherchen (GenBank, EMBL, DDBJ, SWISS-PROT) wurden mit dem BLAST-Algorithmus (BLAST = Basic Local Alignment Search Tool) durchgeführt (Altschul *et al.* 1990). Um mögliche Anhaltspunkte auf die Funktion und Lokalisation eines Proteins zu erhalten wurden die entsprechenden Aminosäuresequenzen mit den Analyse-Programmen des ExPASy-Server (ExPASy = Expert Protein Analysis System) auf mögliche konservierte funktionelle Sequenzmotive und Zielsequenzen untersucht (Bairoch and Bucher 1994; Hofmann 1998). Multiple Sequenzvergleiche wurden mit dem Programm Clustal X (Thompson *et al.* 1997) durchgeführt. Zur Erstellung von Dendogrammen diente das Programm PAUP 3.1.1.

7. Molekularbiologische Grundtechniken

Molekularbiologische Grundtechniken wie die Aufreinigung von Nukleinsäuren durch Phenol-Chloroform-Extraktion, die Präzipitation und gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren sowie deren Anfärbung wurden, sofern nicht anders erwähnt, nach Standardprotokollen durchgeführt (Sambrook *et al.* 1989).

Die Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden). Die Restriktion und Ligation von DNA-Fragmenten wurden nach Angaben des jeweiligen Enzymherstellers durchgeführt.

Die Transformation gefrierkompetenter *E. coli* Stämme wurde nach der Methode von Hanahan (Hanahan *et al.* 1991) durchgeführt. Die Transformation elektrokompetenter Bakterien erfolgte im Electro Cell Manipulator 600 (ITC Biotechnology, Heidelberg) nach Herstellerangaben. Zur Anzucht und Selektion positiver Klone wurde LB-Medium [10 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Hefe-Extrakt, 10 g/l NaCl (pH 7.2)] mit Antibiotikazusatz [Ampicillin 50 - 100 µg/ml] verwendet.

Die Isolation von Plasmid-DNA im Minimaßstab erfolgte durch Kochlyse (Holmes and Quigley 1981) oder mit Hilfe des QIAprepSpin Miniprep Kits (Qiagen, Hilden). Im größeren Maßstab wurde Plasmid-DNA nach der Methode der alkalischen Lyse (Birnboim and Doly 1979) mittels JetStar-Säulen (Genomed, Bad Oeynhausen) durchgeführt.

8. DNA-Analysen

8.1 DNA-Isolierung aus Einzelpflanzen

DNA aus Einzelpflanzen wurde nach der Methode von Edwards (Edwards *et al.* 1991) isoliert. Hierzu wurde ein etwa 20-40 mm² großes Blattstück oder ein vollständiges Blatt, je nach dem Entwicklungsstadium der Pflanzen, im Eppendorfgefäß mit einem Pistill zerkleinert und in 400 µl Extraktionspuffer [200 mM Tris/HCl (pH 7.5), 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5 % (w/v) SDS] weitere fünf Sekunden homogenisiert. Um unlösliche Bestandteile zu entfernen, wurden die Extrakte anschließend für mindestens eine Minute bei 13000 UpM (Tischzentrifuge) zentrifugiert. Zur Fällung der DNA wurden 300 µl der Überstände mit dem gleichen Volumen 2-Propanol versetzt, zwei Minuten bei Raumtemperatur belassen und für fünf Minuten bei 13000 UpM (Tischzentrifuge) zentrifugiert. Im Anschluss wurde die DNA getrocknet und in 100 µl sterilem Wasser gelöst. Für die nachfolgenden PCR-Analysen wurden 1-3 µl der hergestellten DNA-Lösung eingesetzt.

8.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

DNA-Fragmente aus genomischer DNA, Plasmid-DNA oder einzelsträngiger cDNA wurden mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (Saiki *et al.* 1988) amplifiziert. Tabelle 2 zeigt eine Zusammenfassung der verwendeten Oligonukleotid-Primer. Sollten die Produkte im Anschluss an die Reaktion kloniert werden, so wurden für die Amplifizierung Primer mit passenden 5'-überhängenden Restriktionsschnittstellen verwendet. Bei analytischen Standard-PCRs wurde Taq-Polymerase (Qbiogene, Illkirch Frankreich) eingesetzt. Bei der Amplifizierung von DNA-Fragmenten zu Klonierungszwecken und bei der Amplifizierung von einzelsträngige cDNA wurde auf Pfu-Polymerase (Stratagene, Heidelberg) oder den Advantage cDNA Polymerase Mix (Clontech, Palo Alto, USA) zurückgegriffen.

Der Standard-Reaktionsmix (20-100 µl) wurde in dem jeweiligen für die Polymerase spezifischen Puffer angesetzt und enthielt 200-500 µM an Desoxynukleotidtriphosphaten, je 1 µM Primer und 0.5-1 U DNA-Polymerase. Pro Reaktion wurden 10-100 ng genomischer DNA, 200-500 pg Plasmid-DNA oder 1-5 µl einzelsträngige cDNA (9.2) eingesetzt. Grundsätzlich wurden die Ansätze zu Beginn für 5 Minuten und zwischen den einzelnen Amplifizierungszyklen für 30 Sekunden bei 95 °C denaturiert. Für die 30 Sekunden dauernde Primer-Anlagerung wurden Temperaturen entsprechend der T_m-Werte der verwendeten Primer gewählt; die Temperaturen variierten zwischen 50 und 65 °C. Alternativ wurden die Anlagerungstemperatur schrittweise über 10 Zyklen von 65 auf 55 °C bzw. von 60 auf 50 °C gesenkt (touch down-PCR). Die Extensionszeiten wurden an die erwartete Produktgröße und

die verwendete Polymerase angepasst und waren 45-180 Sekunden lang. Die Extensionstemperatur betrug 72 °C oder 68 °C im Falle des Advantage cDNA Polymerase Mix. Insgesamt wurden 25-35 Zyklen durchgeführt, wobei der letzte Zyklus mit einer 7 Minuten andauernden Extensionszeit beendet wurde.

8.3 PCR-gestützte Genotypisierung von *hcf*-Mutanten

Zur Genotypisierung von Einzelpflanzen wurde zunächst DNA (5.1) isoliert und dann mittels PCR daraufhin untersucht, ob das entsprechende *hcf*-Allel nachweisbar war, bzw. ob es heterozygot oder homozygot vorlag. Abbildung 3A zeigt schematisch das Prinzip des Nachweises in den Mutanten *hcf107-2*, *hcf155* und *hcf152-1*. I

Im Falle der Mutante *hcf107-2* wurden zwei verschiedene Vorwärts-Primer verwendet. Der Primer MutF ist spezifisch für die durch Insertion und Deletion veränderte Sequenz in *hcf107-2* (Abb. 3A). Der Primer WtF erkennt hingegen die entsprechende Wildtypsequenz. In zwei unabhängigen Reaktionen wurde die DNA mit beiden Primer, jeweils in Kombination mit dem Rückwärtsprimer Rev, getestet (Abb. 3B).

In den T-DNA-Mutanten *hcf155* (Kroll *et al.* 2001) und *hcf152-1* (Meierhoff *et al.* 2003) beruht die PCR-gestützte Genotypisierung auf dem Nachweis der ursächlichen T-DNA-Insertion. In beiden Mutanten ist die T-DNA nicht direkt im betroffenen Gen lokalisiert (Abb. 3A). In der Mutante *hcf155* befindet sie sich in der Promotorregion des Gens etwa 500 bp vom Translationsstart entfernt. Im Falle der Mutante *hcf152-1* ist die T-DNA-Insertion im Intron 5 des 3'-flankierenden Gens At3g09660 lokalisiert und ist somit über 4 kb entfernt vom Gen *HCF152* entfernt.

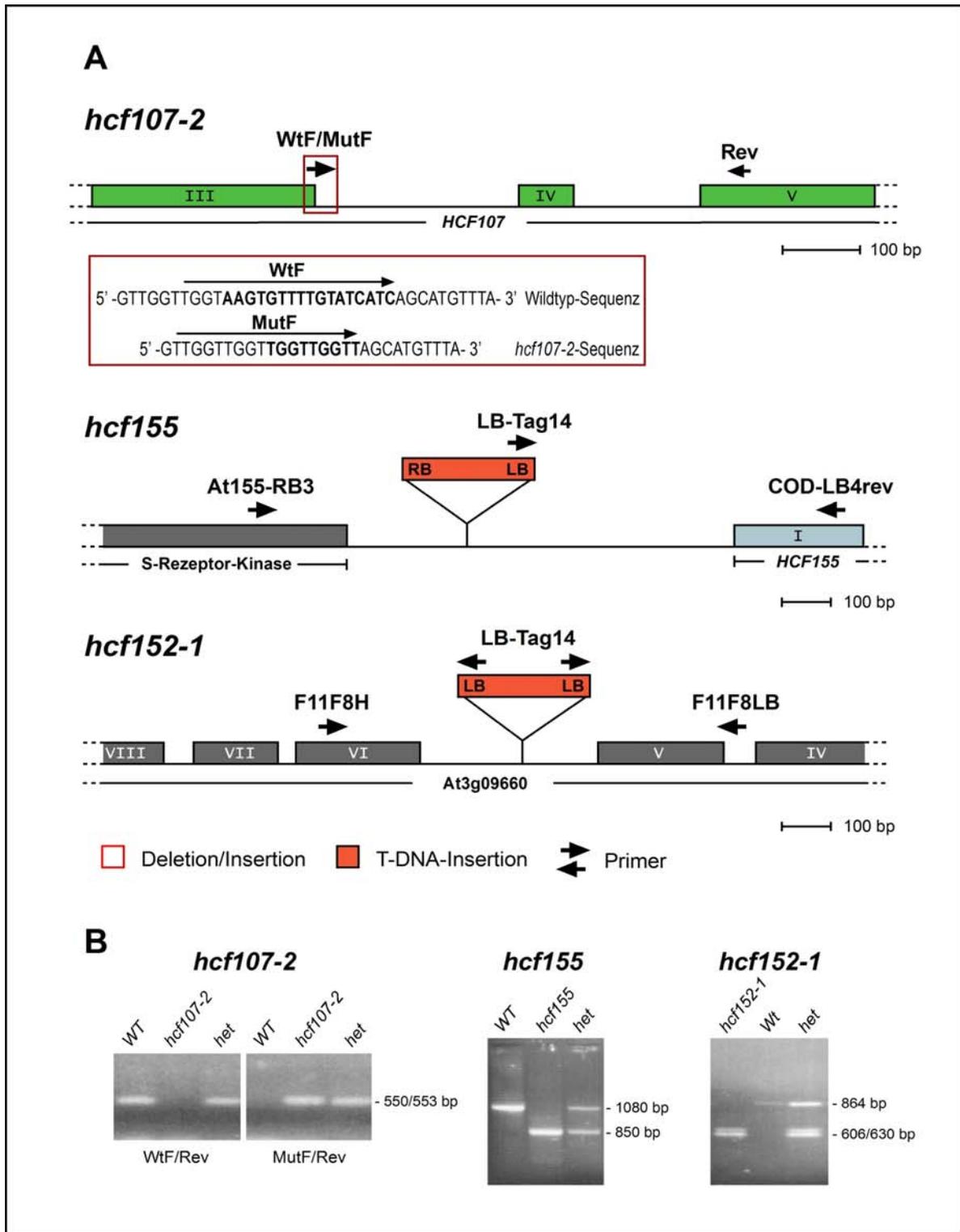


Abb. 3: PCR-gestützte Genotypisierung der Mutanten *hcf107-2*, *hcf155* und *hcf152-1*. (A) Schematische Darstellung der für die Genotypisierung der jeweiligen Mutante relevanten genomischen Bereiche. Lage und Art der Mutation (Deletion/Insertion bzw. T-DNA-Insertion) sind gekennzeichnet. Weiterhin ist die Lage und Orientierung der verwendeten Primer angegeben. (B) Beispiel für die auf PCR basierende Genotypisierung der Mutanten *hcf107-2*, *hcf155* und *hcf152-1*. WT: Wildtyp, het: für das jeweilige Mutanten-Allel heterozygote Pflanzen, *hcf107-2*, *hcf155* und *hcf152-1*: homozygote Mutanten.

9. RNA-Analysen

9.1 Isolation von Gesamt- und Poly (A⁺)-RNA

Das Blattmaterial vier Wochen alter Pflanzen wurde unter flüssigem Stickstoff fein zermörsert. Das Zellpulver wurde in einem Gemisch aus gleichen Volumen Isolationspuffer [330 mM Sorbitol, 200 mM Tris/HCl (pH 9.0), 300 mM NaCl, 10 mM EDTA, 10 mM EGTA, 2 % (w/v) SDS], puffergesättigtem Phenol [0.1 M Tris/HCl (pH 8.0), 0.2 % (v/v) 2-Mercaptoethanol, 0.1 % (w/v) 8-Hydroxychinolin] und Chloroform aufgenommen und 20 Minuten gerührt. Zur Phasentrennung wurde der Ansatz 10 Minuten bei 5000 UpM (Ausschwingrotor, Tischzentrifuge) zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde nochmals mit 1 Volumen Phenol/Chloroform und 1 Volumen Chloroform extrahiert und anschließend die Nukleinsäuren mit 0.3 M Natriumacetat pH 6.0 und 1 Volumen Isopropanol bei -20 °C über Nacht gefällt. Die Nukleinsäuren wurden durch 10-minütige Zentrifugation bei 9000 UpM und bei 4 °C (HB4-Rotor, Sorvallzentrifuge) sedimentiert, kurz im Vakuum angetrocknet und anschließend in Boratpuffer [80 mM Tris/Borat (pH 8.0), 10 mM EDTA] resuspendiert. Schließlich wurde die hochmolekulare RNA selektiv mit 2 M LiCl bei 4 °C über Nacht gefällt und durch eine erneute Zentrifugation sedimentiert. Die RNA wurde zweimal mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und schließlich in sterilem Wasser rückgelöst (Westhoff *et al.* 1991). Die Konzentration der RNA wurde durch Messung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Die Intaktheit der RNA wurde durch gelelektrophoretische Auftrennung und Anfärbung überprüft.

Die Isolation von Poly (A⁺)-RNA erfolgte mit Hilfe von Oligotex (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsalla, Schweden), wobei nach Herstellerangaben verfahren wurde.

9.2 Herstellung von einzelsträngiger cDNA

Zur Herstellung von einzelsträngiger cDNA wurden 0.5 µg Poly-A⁺-RNA mit 20 pmol Oligo-dT₁₈-Primern in insgesamt 10 µl sterilem Wasser gemischt, 10 Minuten auf 70 °C erhitzt und danach für 2 Minuten auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 4 µl 5 x Erststrangpuffer (Gibco BRL, Eggenstein), 2 µl 10 mM DTT und 1 µl 10 mM dNTP-Mix (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) wurden die Ansätze 2 Minuten bei 42 °C inkubiert. Anschließend wurden 200 U Superscript II Reverse Transkriptase (Gibco BRL, Eggenstein) zugesetzt und der gesamte Ansatz weitere 50 Minuten bei 42 °C, und darauf 15 Minuten bei 70 °C inkubiert

9.3 Northern-Analysen

Gesamt-RNA wurde nach der Methode von (McMaster and Carmichael 1977) glyoxyliert, mit $\frac{1}{4}$ Volumen RNA-Probenpuffer [90 % (v/v) Formamid, 10 mM EDTA, 0.01 % (w/v) Bromphenolblau, 0.01% (w/v) Xylencyanol] versetzt und in MOPS-Puffer [25 mM MOPS (pH7.0), 5 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA] auf einem 1.2 %igen Agarosegel, bei einer konstanten Spannung von 130 Volt und 4 °C, für 6 h gelelektrophoretisch aufgetrennt. Je Probentasche wurden 7 µg glyoxylierte RNA geladen. Als Größenstandard wurden je 2,5 µg glyoxylierte, *Pst* I-restringierte λ -DNA eingesetzt. Nach Abschluss der Gelelektrophorese wurde die RNA durch Saugströmung mit 20 x SSC [3 M NaCl, 0.33 M Natriumcitrat (pH 7.0)] auf eine Nylonmembran (Hybond-N, Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden) transferiert und schließlich durch UV-Bestrahlung (300 J/m²) im UV-Crosslinker (Amersham, Braunschweig) fixiert.

Der Nachweis der auf Nylonmembran (Hybond N, Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden) fixierten RNA erfolgte durch Hybridisierung mit radioaktiv markierten Sonden. Dabei wurden über Gelelektion aufgereinigte Restriktionsfragmente verschiedener Plasmide (siehe Ergebnisse) verwendet. Die radioaktive Markierung der Fragmente erfolgte mit dem Megaprime Labeling Kit (Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden) nach der Methode von Feinberg und Volgestein (Feinberg and Vogelstein 1983). Der radioaktive Einbau an α -³²PdATP wurde mit Hilfe des Flüssigszintillationszählers überprüft.

Zur Hybridisierung wurden die Filter zunächst für mindestens eine Stunde bei 68 °C in Hybridisierungspuffer [250 mM Na₂HPO₄ (pH 7.2), 7 % (w/v) Natrium-Dodecylsulfat (SDS), 2.5 mM EDTA] vorinkubiert. Anschließend wurden die Filter in Hybridisierungspuffer unter Beibehaltung der Temperatur für weitere 14-18 Stunden unter Rotation im Hybridisierungsofen mit der radioaktiv markierten Sonde hybridisiert. Danach wurden die Filter bei 68°C für jeweils 40 Minuten nacheinander in 2.5 x SSC/ 1 % SDS, 1.0 x SSC/ 1 % SDS, 0.5 x SSC/ 1% SDS und 0.1 %/ 1 % SDS gewaschen [1 x SSC: 150 mM NaCl, 16.5 mM Natriumcitrat (pH 7.0)], (Church and Gilbert 1984; Rosche and Westhoff 1995). Die fertigen Filter wurden in Haushaltsfolie eingeschlagen und mehrere Stunden bis Tage bei -80 °C auf Röntgenfilm (Kodak X-Omat AR5, Kodak GmbH, Rochester, USA) unter Einsatz einer Verstärkerfolie (Cronex Quanta III, Du Pont, Wilmington, USA) exponiert.

10. Protein-Analysen

10.1. Isolierung von Membranproteinen aus Rohhomogenaten

Das Blattmaterial vier Wochen alter Pflanzen wurde unter flüssigem Stickstoff fein zermörsert. Das Zellpulver wurde in eiskaltem Extraktionspuffer [50 mM Tris/HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA, 2 mM EGTA, 10 mM DTE] resuspendiert und für weitere 10 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurde die Suspension durch zwei Lagen Miracloth filtriert und für 15 Minuten bei 10000 UpM und 4 °C zentrifugiert (SS-34-Rotor, Sorvall-Zentrifuge RC 5B). Die sedimentierten Gesamtmembranen wurden in einem geringen Volumen Probenpuffer (100 mM Na₂CO₃, 10% (w/v) Saccharose, 10 mM DTE) resuspendiert und im Anschluss die Proteinkonzentration der Proben bestimmt.

10.2 Isolierung von Chloroplasten

Das Blattmaterial vier Wochen alter Pflanzen wurde im Waring Blender, in 10 ml Heber A-Medium [330 mM Sorbitol, 88 mM MES/NaOH (pH 6.1), 10 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 0.5 mM KH₂PO₄, 0.2 mM EDTA] je 1g Frischgewicht, für 2 x 2 Sekunden zerkleinert und durch 3 Lagen Miracloth filtriert. Anschließend wurde das Filtrat kurz auf 6000 UpM (GSA-Rotor, Sorvall-Zentrifuge RC 5B) beschleunigt und das Sediment in etwa 1/100 Volumen Heber A-Medium vorsichtig durch Schwenken resuspendiert. Falls erforderlich wurden aus dieser Chloroplastenmischung intakte Chloroplasten über eine Zentrifugation im Percollgradienten isoliert. Dazu wurden 2-3 ml Chloroplastensuspension auf einen Percollstufengradienten [12 ml: 85 % (w/v) Percoll, 2.55 % (w/v) PEG 6000, 0.85 % (w/v) BSA, 0.85 % (w/v) Ficoll] und 10 ml: 45 % (w/v) Percoll, 1.35 % (w/v) PEG 6000, 0.45 % (w/v) BSA, 0.45 % (w/v) Ficoll, jeweils in 330 mM Sorbitol, 50 mM Hepes/KOH (pH 7.8), 2 mM EDTA, 1 mM MgCl₂, 0.03 % (w/v) DTT] in einem Corex-Zentrugationsröhrchen (30 ml Volumen) geschichtet und 10 Minuten bei 8000 UpM im HB4-Ausschwingrotor (Sorvall-Zentrifuge RC 5B) zentrifugiert. Die untere Bande mit den intakten Chloroplasten wurde geerntet und zweimal mit 3 Volumen Waschmedium [330 mM Sorbitol, Hepes/KOH (pH 7.8)] gewaschen (Zentrifugation bei 6000 UpM für 120 s, HB4-Ausschwingrotor, Sorvall-Zentrifuge RC B5). Schließlich wurden die intakten Chloroplasten in etwa 1/10 Volumen Waschmedium resuspendiert.

10.3 Konzentrationsbestimmung von Chlorophyll

Zur Chlorophyllbestimmung wurden 2.5 bis 5.0 µl Chloroplasten- oder Membransuspension in je 1 ml 80 % Aceton resuspendiert und 5 Minuten bei Raumtemperatur und 13000 UpM (Tischzentrifuge) zentrifugiert. Anschließend wurde die Absorption des chlorophyllhaltigen Überstandes im Spektralphotometer bei 645 und 663 nm gemessen und die Chlorophyllkonzentration nach den Formeln von MacKinney (MacKinney 1941) wie folgt berechnet:

$$C_{\text{chl a}} (\mu\text{g/ml}) = 12.7 \times A_{663} - 2.69 \times A_{645}$$

$$C_{\text{chl b}} (\mu\text{g/ml}) = 22.9 \times A_{645} - 4.48 \times A_{663}$$

$$C_{\text{chl total}} = C_{\text{chl a}} + C_{\text{chl b}}$$

10.4 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Proteinkonzentration wurde nach der Methode von Bradford (Bradford 1976) bestimmt. Hierzu wurden Membranproteine zur Solubilisierung zunächst mit 10 % (w/v) Octyl-β-D-glucopyranosid 1:10 bis 1:20 verdünnt. Im Anschluss wurden 2.5-5 µl der Verdünnung mit 1 ml Bradford-Reagenz gemischt, 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und die Absorption bei 595 nm im Spektralphotometer ermittelt. Zur Konzentrationsbestimmung wurden Eichkurven mit BSA als Standardprotein erstellt.

10.5 Fraktionierung der Chloroplasten in Stroma und Membranen - Salzwaschung von Chloroplastenmembranen

Für die Fraktionierung von Chloroplasten wurden intakte Chloroplasten, wie unter Kapitel 7.3 beschrieben, isoliert. Davon abweichend, wurden die Chloroplasten nach der letzten Sedimentation in Lysissmedium [10 mM Hepes/KOH (pH 7.8), 10 mM MgCl₂] resuspendiert und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Durch eine 15-minütige Zentrifugation bei 10000 UpM und 4 °C (HB4-Ausschwingrotor, Sorvall-Zentrifuge RC 5B) wurden die Chloroplastenmembranen sedimentiert, ein weiteres Mal mit 20 Volumen Lysissmedium gewaschen und schließlich in Probenpuffer [50 mM Na₂CO₃, 5 % (w/v) Saccharose, 25 mM DTT] resuspendiert. Alternativ wurden die Chloroplastenmembranen mit 200 mM NaCl, 10 mM Hepes/KOH (pH 7.8) und 200 mM Na₂CO₃ gewaschen. Der Überstand mit den löslichen Proteinen wurde mit Trichloressigsäure ad 15 % (w/v) Endkonzentration versetzt, 20 Minuten auf Eis inkubiert und weitere 20 Minuten bei 10000 UpM und 4 °C (HB4-Ausschwingrotor, Sorvall-Zentrifuge RC 5B) zentrifugiert. Im Anschluss wurde das Pellet zweimal mit 80 % (v/v) Aceton

gewaschen, getrocknet und in Probenpuffer resuspendiert. Die Chlorophyll- bzw. Proteinkonzentration der Proben wurde, wie unter Punkt 7.5 und 7.6 beschrieben, bestimmt.

10.6 Detergenz-Solubilisierung plastidärer Proteine

Chloroplasten wurden, wie unter Kapitel 10.2 beschrieben, isoliert und in Lysiummedium [10 mM Hepes/KOH (pH 7.8), 10 mM MgCl₂, 25 mM KCl] 10 Minuten auf Eis lysiert. Die Chlorophyllkonzentration der Ansätze wurde bestimmt und die Chloroplastenmembranen in Lysiummedium mit einer Endkonzentration von 0.25 bis 1.5 % (w/v) des jeweiligen Detergenz [Digitonin, CHAPS (Cholamidopropyl-dimethylammonio-1-propansulfonat) oder Octyl-β-D-glucopyranosid] bei einer Chlorophyllkonzentration von 1 mg/ml (Endkonzentration), 30 Minuten auf Eis solubilisiert. Um unlösliche Bestandteile zu entfernen, wurden die Ansätze anschließend 20 Minuten bei 16.000 g und 4 °C zentrifugiert. Die Solubilisierungsüberstände wurden entweder direkt mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese oder Blue-Native-Gelelektrophorese analysiert, oder wie unter Kapitel 10.7 und 10.11.2 beschrieben, weiterbehandelt.

10.7 Auftrennung plastidärer Membrankomplexe über Zentrifugation in einem Saccharosegradienten

Die Detergenz-solubilisierete Chloroplastenproteine (Kap. 10.6) wurden mit 1/20 Volumen 10 %igen (w/v) n-Dodecyl-β-D-maltosid, 10 mM Hepes/KOH (pH 7.8), 10 mM MgCl₂, 25 mM KCl versetzt und zwei Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 500 µl auf einen linearen Saccharosegradienten [0.1 bis 1.0 M Saccharose in Lysiummedium mit 0.06 % (w/v) n-Dodecyl-β-D-maltosid] geladen und 16-17 Stunden bei 38.600 UpM (entspricht etwa 180.000 g im mittleren Radius) und 4 °C im SW40Ti-Rotor zentrifugiert. Nach Abschluss der Ultrazentrifugation wurden die Gradienten bei 4 °C mit Hilfe eines Gradientenernters (Beckmann) von unten nach oben in 1 ml-Fractionen geerntet. Zur weiteren Analyse wurden diese Fractionen mit 15 % (w/v) Trichloressigsäure auf Eis gefällt und schließlich in 60-80 µl Probenpuffer [50 mM Na₂CO₃, 5 % (w/v) Saccharose, 25 mM DTT] mit 2.5 % (w/v) SDS und 0.01 % (w/v) Bromphenolblau] resuspendiert.

10.8. Blue-Native Gelelektrophorese

Die native Auftrennung Detergenz-solubilisierter Chloroplastenfraktionen wurde basierend auf der Methode von Schägger und von Jagow (Schägger and von Jagow 1991) durchgeführt. Hierzu wurden 15-50 µl der Detergenz-solubilisierten Chloroplastenproteine (Kap. 10.6) mit einer Lösung aus 10 % (w/v) n-Dodecyl-β-D-maltosid, 10 mM Hepes/KOH (pH 7.8), 10 mM MgCl₂, 25 mM KCl auf eine n-Dodecyl-β-D-maltosid-Konzentration von 0.2-0.8 % (w/v) eingestellt, zwei Minuten auf Eis inkubiert und anschließend mit 1/10 Volumen Ladepuffer [5 % (w/v) Serva blue G, 750 mM ε-Aminocapronsäure] versetzt. Zur Auftrennung wurde die so vorbehandelten die Proben auf ein vorgekühltes Gelsystem (ca. 4°-8°C) aus einem Sammelgel [4 % Polyacrylamid; Acrylamid/Bisacrylamid=30:0.8, 500 mM ε-Aminocapronsäure, 50 mM Bis-Tris/HCl, pH 7.0] und einem Trenngel [Gradient 4%-12% Polyacrylamid; Acrylamid/Bisacrylamid=30:0.8, 500 mM ε-Aminocapronsäure, 50 mM Bis-Tris/HCl, pH 7.0] geladen. Die Gesamtgelgröße betrug 20 x 20 x 0.1 cm. Als Kathodenpuffer dient eine Lösung bestehend aus [50 mM Tricin, 15 mM Bis-Tris/HCl, pH 7.0 und 0.02 % (w/v) Serva blue G] verwendet. Als Anodenpuffer wurde eine Lösung bestehend aus [50 mM Bis-Tris/HCl, pH 7.0] eingesetzt. Zum Einlauf der Proben wurde eine Spannung von 100-150 Volt angelegt. Wenn die Proben in das Trenngel eingewandert waren, wurde die Spannung schrittweise auf 750-1000 Volt erhöht. Nach dem die Coomassie Blau-Lauffront etwa die Hälfte des Trenngels erreicht hatte, wurde der Kathodenpuffer gegen Kathodenpuffer ohne Farbstoff ausgetauscht. Nach Abschluss der Gelelektrophorese wurde das Gel 20-30 Minuten in Solubilisierungslösung [66 mM Na₂CO₃, 2 % (w/v) SDS, 66 mM DTT] geschwenkt und schließlich die aufgetrennten Proteine mittels Western-Transfer auf Nitrocellulosemembranen fixiert.

10.9 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die isolierten Proteine wurden nach der von Schägger und von Jagow beschriebenen Methode der Tricin-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt (Schägger and von Jagow 1987). Hierbei wurde ein diskontinuierliches Gelsystem verwendet, das sich aus einem Sammelgel [4 % (w/v) Polyacrylamid; Acrylamid/Methylenbis-acrylamid = 32:1, 0.744 M Tris/HCl (pH 8.45), 0.0744 % (w/v) SDS] und einem Trenngel [10 % (w/v) Polyacrylamid, 1M Tris/HCl (pH 8.45), 0.1 % (w/v) SDS] zusammensetzte. Die Gelstärke betrug 0.01 cm, die Trennstrecke 18 cm. Zur besseren Auflösung des niedermolekularen Bereiches wurde gegebenenfalls die Acrylamidkonzentration im Trenngel auf 12.5 % erhöht. Bei der Auftrennung von Membranproteinen wurde dem Trenngel Harnstoff ad 6 M beigefügt. Der Kathodenpuffer setzte sich aus 100 mM Tris/HCl, pH 8.25, 100 mM Tricin und 0.1 % (w/v)

SDS zusammen. Als Anodenpuffer wurde 1 M Tris/HCl, pH 8.9 verwendet. Zur Vorbereitung der Proben auf die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden diese zunächst in Probenpuffer [50 mM Na₂CO₃, 5 % (w/v) Saccharose, 25 mM DTT] mit 2.5 % (w/v) SDS und 0.01 % (w/v) Bromphenolblau durch eine 15-minütige Inkubation bei Raumtemperatur und 30-sekündigem Erhitzen auf 70 °C denaturiert. Um unlösliche Bestandteile zu entfernen, wurden die Ansätze im Anschluss 5 Minuten bei 13000 UpM und Raumtemperatur zentrifugiert (Tischzentrifuge). Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 80-100 Volt für 16-18 Stunden bei Raumtemperatur. Falls erforderlich wurden die aufgetrennten Proteine nach Abschluss der Elektrophorese mit Coomassie-Farbstoff [0.25 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250, 50 % (v/v) Methanol, 7 % (v/v) Essigsäure] angefärbt (Congdon *et al.* 1993).

10.10 Immunoblot-Analyse von Proteinen

Die gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden mittels Western-Transfer auf Nitrocellulosemembranen fixiert. Dabei wurde nach der Methode von Towbin (Towbin *et al.* 1979) verfahren. Nach Abschluss der Gelelektrophorese wurde das Gel zunächst 15 Minuten in Transferpuffer [96 mM Glycin, 10 mM Tris, 0.05 % (w/v) SDS, 10 % (v/v) Methanol] geschwenkt. Die Nitrocellulosemembran wurde zwei Minuten in sterilem Wasser und im Anschluss weitere 5-10 Minuten in Transferpuffer vorgetränkt. Der Transfer erfolgte mit Hilfe von Trockenblot-Apparaturen (Multiphor II Nova Blot, LKB; Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) nach der „Semi-Dry“-Methode. Insgesamt wurden sieben Lagen in Transfer-Puffer vorgetränktes Filterpapier verwendet. Der Transfer wurde für zwei Stunden bei Raumtemperatur und einer konstanten Stromstärke von 0.4 mA/cm² Filterfläche durchgeführt.

Zum Nachweis der auf Nitrocellulosemembranen fixierten Proteine wurden zunächst die freien Bindungsstellen der Filter durch einstündige Inkubation bei Raumtemperatur in Rotiblock-Reagenz (Roth, Karlsruhe) blockiert. Anschließend wurde die Filter 15 Minuten in TBS-T [20 mM Tris/HCl (pH 7.6), 137 mM NaCl, 0.1 % (v/v) Triton X-100] gewaschen. Die Inkubation mit den in TBS-T verdünnten Erstantikörpern (1:1000 bis 1:3000) erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C. Im Anschluss wurden die Filter dreimal in TBS-T gewaschen und eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem gegen den Erstantikörper gerichteten Zweitantikörper (Peroxidase-konjugierte Ziege Anti-Kaninchen oder Kaninchen Anti-Maus IgGs, Sigma-Aldrich, München), in einer Verdünnung von 1:5000-1:80000 inkubiert. Nach drei weiteren Waschungen in TBS-T wurden die gebundenen Antikörper mit Hilfe des ECL-System (Enhanced Chemoluminescence Systems, Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden) detektiert und die Filter gegen Röntgenfilm (Kodak X-

Omat AR5, Kodak GmbH, Rochester, USA) exponiert. Sollten später mit den Filtern noch weitere Antikörperinkubationen durchgeführt werden, so wurde die Waschprozedur nach Ablauf der ECL-Reaktion wiederholt und die Filter bei 4 °C gelagert.

Der Nachweis Protein A-etikettierter Proteine erfolgte abweichend zur beschriebenen Prozedur direkt durch den Zweitantikörper (Peroxidase-konjugierte Kaninchen Anti-Maus IgGs, Sigma-Aldrich, München), wodurch die Inkubation mit dem Erstantikörper entfiel.

10.11 Affinitätschromatographie Protein A-etikettierter Proteine an IgG-Sepharose

10.11.1 Vorbereitung der IgG-Sepharose

Die für die Affinitätschromatographie verwendete IgG-Sepharose 6 Fast Flow (6 % Agarose, highly crosslinked, Amersham Biosciences Uppsala, Schweden) wurde durch zweimaliges Waschen mit Waschmedium [150 mM NaCl, 10 mM Hepes/KOH (pH 7.8), 0.1 % (w/v) n-Dodecyl- β -D-maltosid] vorbereitet. Dazu wurden 500-1000 μ l 80 %iger Sepharosesuspension im 20-fachen Volumen Waschmedium (10-20 ml) resuspendiert und fünf Minuten bei 5000 UpM und 4 °C (Ausschwingrotor, Hettich-Zentrifuge) zentrifugiert. Im Anschluss wurde das Sediment aus Sepharose (400-800 μ l Bettvolumen) nochmals im 20-fachen Volumen Waschmedium gewaschen und schließlich in 500-1000 μ l Waschmedium (Endvolumen) resuspendiert.

10.11.2 IgG-Affinitätschromatographie

Chloroplasten aus etwa 20-40 g Blattmaterial vier Wochen alter Protein A-etikettierter Komplementanten (*Hcf107cPA*, *Hcf155cPA*) wurden wie unter Kapitel 10.2 beschrieben isoliert und mit Digitonin solubilisiert (Kap. 10.6).

Die Detergenz-solubilierten Chloroplastenproteine (1-2 ml, äquivalent zu 1000-2000 μ g Chlorophyll) wurden mit 300-500 μ l IgG-Sepharose (Bettvolumen) in Gegenwart von Protease-Inhibitoren (Protease-Inhibitoren-Cocktail, Complete, EDTA-frei, Roche Mannheim) zwei Stunden bei 4 °C auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Nach Abschluss der Inkubation wurde der Ansatz in Polypropylen-Chromatographie-Säulen (Bio-Rad, 0.8 x 4 cm) überführt und die IgG-Sepharose sich sedimentieren lassen. Die Säule wurde dann mit 20-30 ml Waschmedium [150 mM NaCl, 10 mM Hepes/KOH (pH 7.8), 0.1 % (w/v) n-Dodecyl- β -D-maltosid] bei 4 °C gewaschen und schließlich bei Raumtemperatur mit dem 10-fachen Bettvolumen 1 % (w/v) SDS (3-5 ml) eluiert. Das Eluat wurde mit Trichloressigsäure ad 15 %

(w/v) Endkonzentration versetzt, 20 Minuten auf Eis inkubiert und die gefällten Proteine 20 Minuten bei 10000 UpM und 4 °C (HB4-Ausschwingrotor, Sorvall-Zentrifuge RC 5B) sedimentiert. Die präzipitierten Proteine wurde zweimal mit 80 % (v/v) Aceton gewaschen, getrocknet und in 50-100 µl Probenpuffer [50 mM Na₂CO₃, 5 % (w/v) Saccharose, 25 mM DTT] mit 2.5 % (w/v) SDS und 0.01 % (w/v) Bromphenolblau] gelöst.

Für den Nachweis von RNAs erfolgte die Extraktion des Eluat mit 20 µl Hefe-tRNA (11 µg/µl) versetzt, mit 1 Volumen Phenol/1 Volumen Chloroform und 1 Volumen Chloroform extrahiert und die RNA in der wässrigen Phase mit 0.3 M Natriumacetat pH 6.0 und 1 Volumen Isopropanol bei -20 °C über Nacht ausgefällt. Am nächsten Tag wurde die gefällte RNA durch eine 10-minütige Zentrifugation bei 9.000 UpM und 4 °C (HB4-Ausschwingrotor, Sorvall-Zentrifuge) sedimentiert, kurz im Vakuum angetrocknet und schließlich in 40 µl sterilem Wasser zurückgelöst.

10.11.3 Nachweis von Plastiden-RNAs mittels RT-PCR

Für den Nachweis von Plastiden-RNAs wurden 10 µl der RNA-Probe mit 0.5 µl RNase-Inhibitor (Roche Applied Science, Mannheim) versetzt und in einem Gesamtvolumen von 20 µl mit 20 U DNase (RNase-frei, Roche Applied Science, Mannheim) eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Als Positiv-Kontrolle wurden 100 ng Wildtyp-Gesamt-RNA des Ökotyps Columbia eingesetzt (20 µl Gesamtvolumen) und in Folge parallel zu den Proben weiterbehandelt. Im Anschluss an die Inkubation wurde die DNase durch 15-minütiges Erhitzen bei 68 °C deaktiviert und 1/5 des Ansatzes, wie unter Kapitel 9.2 beschrieben, mittels RT-PCR in cDNA umgeschrieben. Für die Erststrangsynthese wurden dabei sequenzspezifische Oligonukleotid-Primer verwendet. Für die folgenden Amplifizierungsreaktion wurden 4 µl des Erststrangsynthese-Ansatzes eingesetzt. Die Reaktion wurden in einem Gesamtvolumen von 50 µl mit sequenzspezifischen Primern (je 1 µM), 500 µM dNTP-Mix und 0.5 µl 50 x Advantage cDNA Polymerase Mix (Clontech, Palo Alto, USA) in 1X cDNA PCR Reaktionspuffer (Clontech, Palo Alto, USA) durchgeführt. Die Reaktionsbedingungen wurden dabei wie unter Kapitel 8.2 beschrieben gewählt.

III. Ergebnisse

Aufgrund von Kartierungs- und Sequenzierungsergebnissen wurde vermutet, dass das in den Mutanten *hcf107-1* und *hcf107-2* von der Mutation betroffene Gen *HCF107* alleine für den *hcf*-Phänotyp der Mutante verantwortlich ist. Um dieses zu überprüfen und das Gen *HCF107* weitergehend zu charakterisieren sollte zunächst die Expression des Gens untersucht und schließlich die Mutante *hcf107-2* mit der isolierten cDNA komplementiert werden.

1. Klonierung einer *HCF107*-cDNA mit vollständigem Leseraster und Expressionsanalyse des Gens *HCF107* in den Mutanten *hcf107-1* und *hcf107-2*

Für diese weiterführenden Experimente musste als erstes eine cDNA des Gens *HCF107* kloniert werden. Hierzu wurden anhand der vorhandenen Sequenzdaten Primer synthetisiert, deren Bindungsstellen 105 Nukleotide vor dem Startcodon (44F-Bcl) bzw. 62 Nukleotide hinter dem Stopcodon (Cen1F-Bcl) lagen, und die cDNA mittels RT-PCR ausgehend von Poly(A)⁺-RNA des Ökotyps Columbia gewonnen. Über die mit den Primern angefügten *BclI*-Schnittstellen wurde das PCR-Produkt in die *BamHI*-Schnittstelle des Pflanzentransformationsvektors pPCV91 kloniert. Das Insert des hieraus resultierenden cDNA-Komplementationskonstruktes pPCV91-107 (Abb. 6) mit einer Länge von 2124 Basenpaaren wurde vollständig sequenziert. Die vollständige Sequenz der klonierten *HCF107*-cDNA und die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz sind im Anhang aufgeführt.

Im nächsten Schritt wurde dann die Expression des *HCF107*-Gens untersucht. Zu diesem Zweck wurde eine Northern-Analyse mit Gesamt-RNA aus vier Wochen alten homozygoten Mutanten bzw. Wildtyp-Pflanzen durchgeführt. Als Sonde wurde die zuvor klonierte *HCF107*-cDNA eingesetzt.

Im Wildtyp und der EMS-Mutante *hcf107-1* konnte ein Transkript mit der Größe von 2 kb, in der T-DNA-Mutante *hcf107-2* von etwa 2.4 kb detektiert werden (Abb 4.). Das größere Transkript in der Mutante *hcf107-2* ist, wie bereits durch die Sequenzierung des entsprechenden RT-PCR-Produktes bekannt war, auf die durch die T-DNA-Mutagenese verursachte Deletion/Insertion an der Exon 3/Intron 3-Grenze zurückzuführen. Diese hat zur Folge, dass das Intron 3 nicht mehr vollständig herausgeschnitten wird und es verbleiben Reste des Introns im reifen Transkript (Sane *et al.* 2004, Manuskript in Vorbereitung).

Die Transkriptspiegel unterscheiden sich im Falle der EMS-Mutante *hcf107-1* nur geringfügig vom Wildtyp. Hingegen sind die *HCF107*-Transkriptspiegel in der T-DNA-Mutante *hcf107-2* auf unter 50 % des Wildtyp-Niveaus reduziert (Abb. 4).

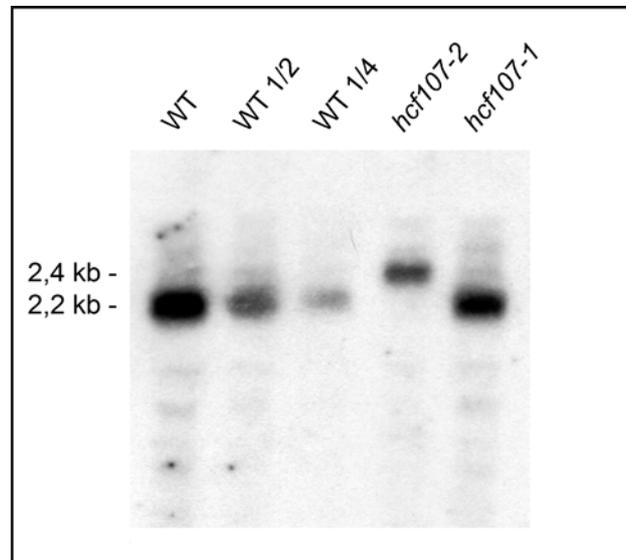


Abb. 4: Northern-Analyse der *HCF107*-Transkripte der Mutanten *hcf107-1* und *hcf107-2* im Vergleich zum Wildtyp (WT). 7 µg (WT, *hcf107-1* und *hcf107-2*), 3.5 µg (WT 1/2) bzw. 1.75 µg (WT 1/4) Gesamt-RNA wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit einer Sonde gegen *HCF107*-Transkripte hybridisiert. Als Hybridisierungssonde wurde ein radioaktiv markiertes, den vollständigen Leserahmen der *HCF107*-cDNA umfassendes, Restriktionsfragment verwendet. Der Filter wurde 10 Tage auf Röntgenfilm exponiert.

2. Komplementation der Mutante *hcf107-2* und Herstellung Epitop-markierter Komplementanten-Linien

Mit der Komplementation der Mutante *hcf107-2* wurden zwei unterschiedliche Ziele verfolgt. Zum einem sollten durch die Komplementation der Mutante mit dem cDNA-Konstrukt pPCV91-107 (Abb 6.) der Beweis erbracht werden, dass die Mutation im *HCF107*-Gen auch für den beschriebenen Phänotyp der Mutante *hcf107* verantwortlich ist. Zum anderen sollte für die weiter funktionelle Analyse des Gens *HCF107* die Herstellung Epitop-markierter Komplementantenlinien erfolgen. Dieser Ansatz beruht auf der Komplementation der Mutante mit einer Epitop-markierten Version des Proteins. Mit Hilfe des angefügten Epitops sollte in Folge der Nachweis des Proteins mit kommerziell erhältlichen Antikörpern durchgeführt werden und die biochemische Aufreinigung des Proteins und möglicher interagierender Komponenten mittels Affinitätschromatographie erfolgen.

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Arten C-terminaler Fusionsproteine für die Komplementationsexperimente verwendet. Zum einen eine 148 Aminosäuren große Protein A-Kassette (PA), bestehend aus zwei IgG-Bindedomänen und einer N-terminalen TEV (Tabacco Etch Virus)-Protease-Erkennungssequenz. Zum anderen ein 9 Aminosäuren kurzes Peptid aus dem Hämagglutinin (HA) des Influenza A-Virus (Abb. 5).

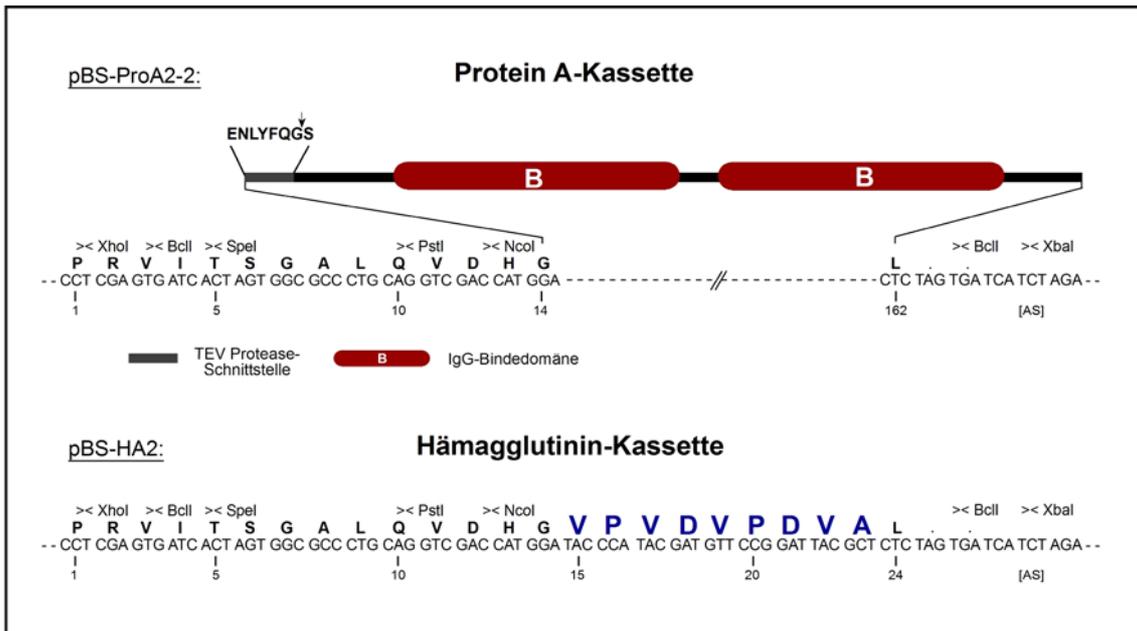


Abb. 5: Schematische Darstellung der verwendeten Epitop-Kassetten. Gezeigt werden die für die Herstellung der Komplementationskonstrukte relevanten Bereiche der Plasmide pBS-ProA2-2 und pBS-HA2 (XhoI-XbaI-Fragment). Zur Herstellung des Plasmides pBS-ProA2-2 wurde die Protein A-Kassette des Hefe-Vektors pYM8-4 (Prof. W.-H. Kunau, Bochum) aus zwei IgG-Bindedomänen und N-terminaler TEV (Tabacco Etch Virus)-Protease-Erkennungssequenz mit den Primern ProA-BclIIH (5'-CAG CCT CGA GTG ATC ACT AGT GGC GCC CTG CAG GTC GAC CAT GGA TCC GAG AAT CTT TAT TTT CAG GGA TCC-3') und ProA-BclIIR (5'-ATT TAG TCT AGA TGA TCA CTA AAG AGC CGC GGA ATT CGC A-3') mittels PCR amplifiziert und über die angefügten XhoI- und XbaI-Restriktionsschnittstellen in den Vektor pBlueskript KSII+ inseriert (pBS-ProA2-2). Das Plasmid pBS-HA2 leitet sich von pBS-ProA2-2 ab und wurde durch Austausch der Protein A-Kassette gegen das Hämagglutinin (HA)-Epitop (blau) erzeugt.

Die Herstellung der entsprechenden Fusionskonstrukte erfolgte ausgehend vom cDNA-Komplementationskonstrukt pPCV91-107 (Abb. 6). Die vollständige *HCF107*-cDNA wurde mittels PCR reamplifiziert und über die dabei angefügten Restriktionsschnittstellen *SpeI* und *NcoI* in den Plasmiden pBS-ProA2-2 und pBS-HA-2 im Leseraster mit dem jeweiligen C-terminalen Epitop fusioniert. Die Sequenz des Inserts wurde durch Sequenzierung auf mögliche Fehler überprüft und in einem weiteren Schritt das *BclI*-Fragment aus *HCF107*-cDNA und c-terminalen Epitop in die *BamHI*-Schnittstelle des Expressionsvektors pPEX001 (B. Reis, MPIZ Köln) inseriert, und somit unter die Kontrolle des CaMV35S-Promotors

gestellt. Die richtige Orientierung der Inserts wurde im Anschluss durch entsprechende Restriktionsanalysen überprüft. Abbildung 6 gibt einen Überblick über die zur Transformation der Mutante *hcf107-2* hergestellten Komplementationskonstrukte.

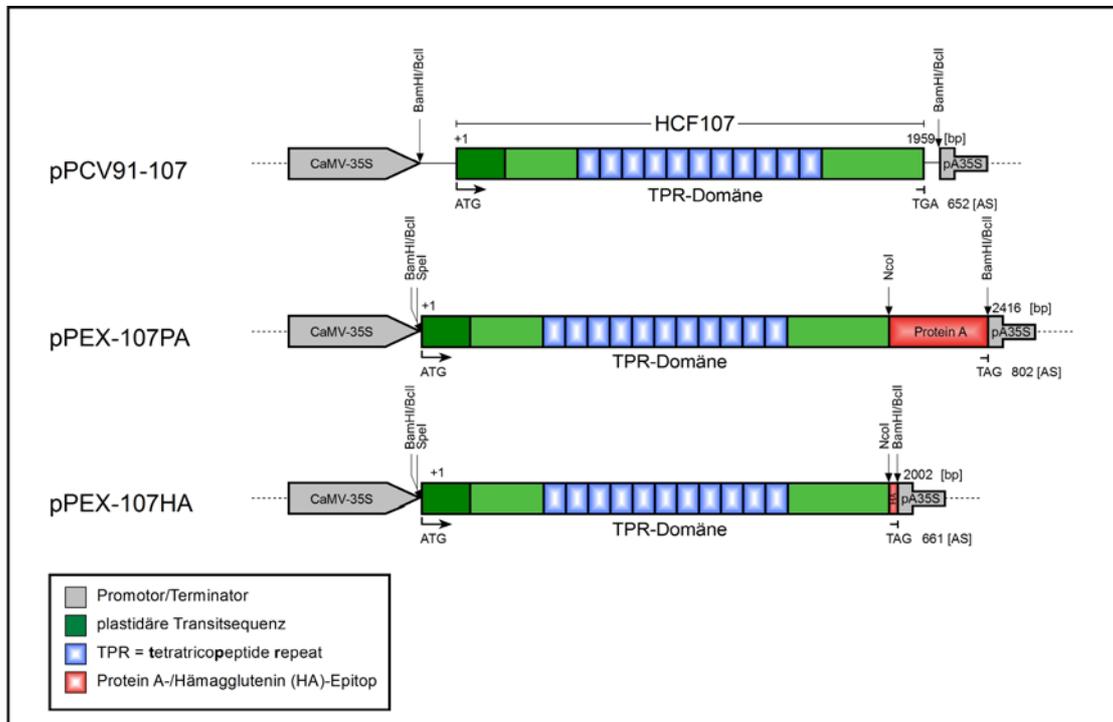


Abb. 6: Überblick über die zur Transformation der Mutante *hcf107-2* eingesetzten Komplementationskonstrukte. Dargestellt sind die jeweiligen Expressionskassetten der angegebenen Plasmide (links). Die für die Herstellung relevanten Restriktions-schnittstellen sind angegeben. CaMV-35S: Promotor, pA35S: Terminator des Cauliflower Mosaic Virus (CaMV).

Zur Komplementation der Mutante *hcf107-2* wurden die Konstrukte zunächst durch Agrobakterien-vermittelte Blümentransformation in heterozygote *hcf107-2* Pflanzen eingeschleust und diese bis zur Samenreife kultiviert. Das gewonnene Saatgut wurde auf zuckerhaltigem Selektionsmedium ausgesät. Die so selektierten Pflanzen wurden im Anschluss mittels PCR-gestützter Marker nach transgenen, und bezüglich der *hcf*-Mutation, homozygoten Pflanzen gesichtet. Insgesamt konnten so nach der Transformation mit dem cDNA-Konstrukt pPCV91-107 in den folgenden Generationen sechs unabhängige homozygote *hcf107-2*-Transformanten identifiziert werden. Alle waren nach dem Umsetzen auf Erde überlebensfähig und konnten bis zur Samenreife regeneriert werden (Bez.: *HCF107c*).

Nach der Transformation mit den Fusionskonstrukten pPEX-107HA und pPEX-107PA konnten fünf bzw. vier transgene homozygote *hcf107-2* Pflanzen identifiziert werden (Bez.:

HCF107cHA/-cPA). Im Falle des Konstruktes pPEX-107PA waren jedoch nur zwei der vier Transformanten auf Erde lebensfähig und konnten bis zur Samenreife regeneriert werden. konnten. Bei keiner der Komplementanten war unter UV-Licht der ursprüngliche *hcf*-(Hoch-Chlorophyll-Fluoreszenz)-Phänotyp noch nachweisbar. In Chlorophyll-Fluoreszenzmessungen zeigten die Komplementanten einen für Wildtyp-Pflanzen typischen Kurvenverlauf (Abb. 7). Die errechneten Werte für das Verhältnis von F_v/F_m liegen mit 0.72-0.78 im Bereich vom Wildtyp (0.76-0.78).

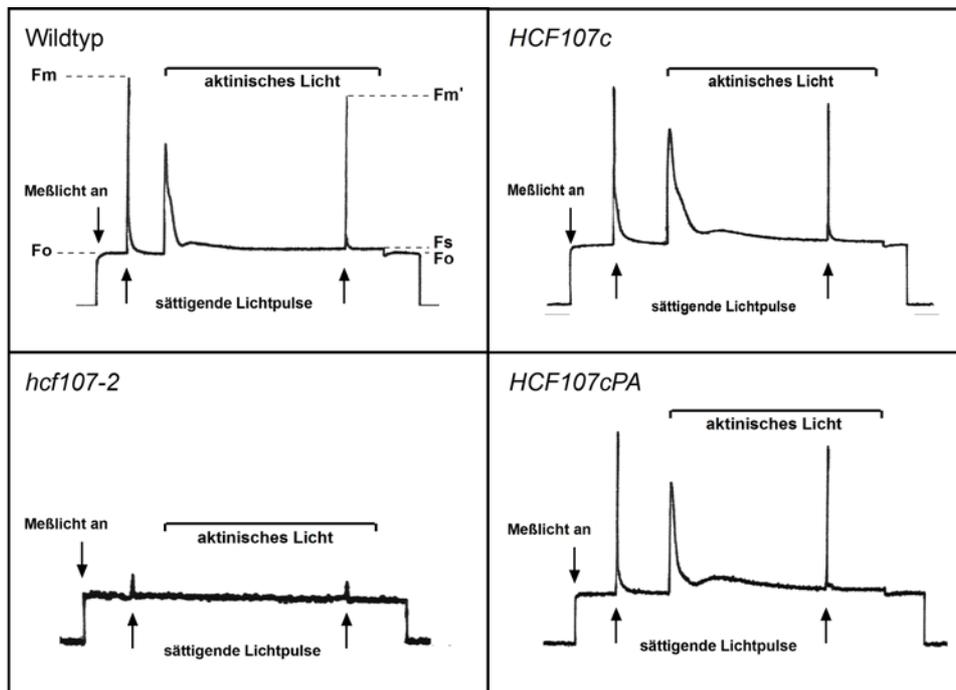


Abb. 7: Chlorophyll-Fluoreszenz-Induktionmessungen von Wildtyp-Pflanzen und der Mutante *hcf107-2* im Vergleich zu den Komplementanten *HCF107c* und *HCF107cPA*. Dargestellt sind repräsentative Messungen aus drei unabhängigen Versuchen. F_0 : Grundfluoreszenz beim Einschalten des Meßlichtes, F_m : maximale Fluoreszenz nach Gabe eines sättigenden Lichtpulses, F_m' : maximale Fluoreszenz beim Einschalten des aktinischen Lichtes, F_s : Photosynthetisches Fließgleichgewicht

Um die Komplementation der Komplementanten *HCF107c* und *HCF107cPA* auf molekularer Ebene zu analysieren wurde, die Expression der Transgene mittels Northernanalysen untersucht. Wie in Abbildung 8 zu erkennen ist, wurden die Transgene erwartungsgemäß transkribiert. Die Transkriptspiegel waren dabei aufgrund des verwendeten CaMV35S-Promotors im Vergleich zum Wildtyp deutlich erhöht. Dies wirkte sich aber nicht negativ auf die Komplementation der Mutanten aus. Northernanalysen der *psbH*-Transkripte zeigten das für Wildtyp-Pflanzen typische Transkriptmuster (Abb. 9). Die in den Mutanten *hcf107-1* und *hcf107-2* fehlenden *psbH*-Transkripte von 400 (*psbH*), 1200 (*psbH-petB*) und 1800 (*psbH-*

petB-petD) Nukleotiden waren in beiden untersuchten komplementierten Linien wieder nachweisbar. Die Transkriptspiegel erreichten dabei das Niveau der Wildtyp-Kontrolle.

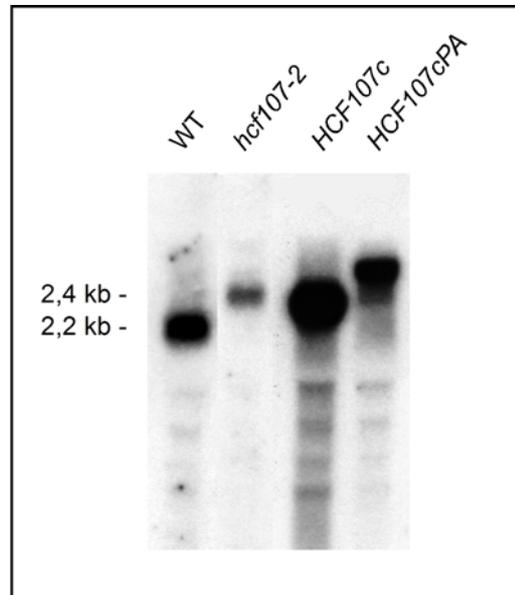


Abb. 8: Northern-Analyse der der HCF107-Transkripte der Komplementanten *HCF107c* und *HCF107cPA* im Vergleich zur Mutante *hcf107-2* und Wildtyp (WT). 7 µg Gesamt-RNA wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit einer Sonde gegen *HCF107*-Transkripte hybridisiert. Als Hybridisierungssonde wurde das radioaktiv markierte, den vollständigen Leserahmen umfassende, *EcoRI/PstI*-Fragment des *HCF107cDNA* Klons pBS7/5 verwendet. Der Filter wurde für 10 Tage auf Röntgenfilm exponiert.

Auf Proteinebene bestätigte sich dieses Bild. Immunoblotanalysen von Thylakoidmembranproteinen zeigten, dass die in der Mutante nicht detektierbaren Untereinheiten des Photosystems II, PsbH und PsbB (CP47), in den Komplementanten wieder in mit dem Wildtyp vergleichbaren Mengen vorhanden waren (Abb. 10).

Die Ergebnisse dieser Versuche verdeutlichen, dass sich die Mutante *hcf107-2* durch Einschleusen der *HCF107*-cDNA (pPCV91-107) oder eines der beiden cDNA-Epitop-Fusionskonstrukte (pPEX-107PA, pPEX-107HA) vollständig komplementieren lässt. Dies bedeutet zum einen, dass das richtige und allein für den Phänotyp der Mutante *hcf107* verantwortliche Gen isoliert wurde. Zum anderen waren die zur Komplementation verwendeten Fusionskonstrukte bzw. die exprimierten Fusionsproteine funktional. Das in der Mutante betroffene *psbB*-Operon wird in den Komplementanten korrekt prozessiert und translatiert. Somit sind die anhand der Epitop-markierten Komplementationslinien erhaltenen Daten direkt auf die Situation im Wildtyp bzw. auf das endogene HCF107-Protein übertragbar.

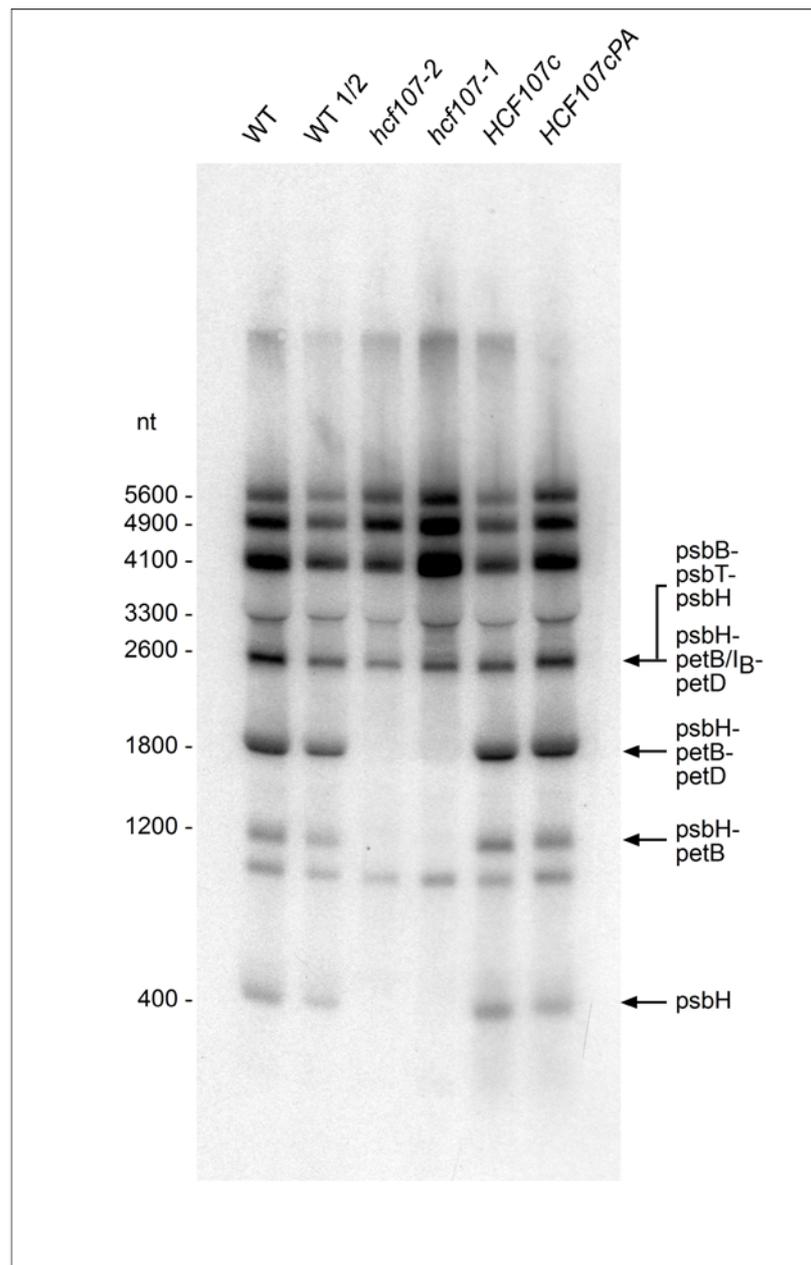


Abb. 9: Northern-Analyse der plastidären *psbH*-Transkripte der Komplementanten *HCF107c* und *HCF107cPA* im Vergleich zum Wildtyp (WT) und der Mutante *hcf107-2*. Es wurden jeweils 7 μ g (WT, *hcf107-2*, *HCF107c* und *HCF107cPA*) bzw. 3,5 μ g (WT 1/2) Gesamt-RNA gelelektrophoretisch aufgetrennt, mittels Northern-Transfer auf eine Nylonmembran transferiert und mit einer Sonde gegen *psbH*-Transkripte hybridisiert. Als Hybridisierungssonde wurde das radioaktiv markierte *Bam*HI-Restriktionsfragment des Klons ptAtpsbH1 verwendet. Die Expositionsdauer des Filters betrug 42 Stunden.

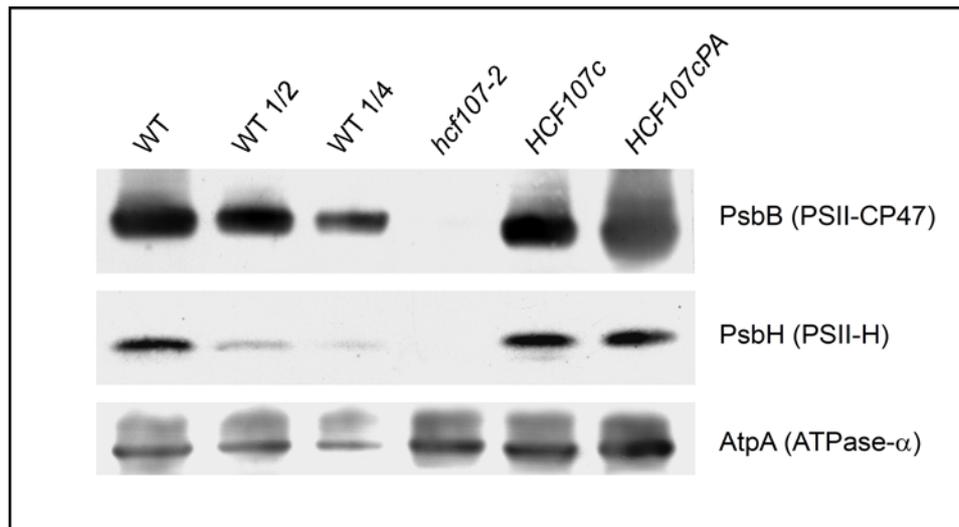


Abb. 10: Immunoblot-Analyse von Thylakoidmembranproteinen der Komplementanten *HCF107c* und *HCF107cPA* im Vergleich zum Wildtyp (WT) und der Mutante *hcf107-2*. Es wurden 30 µg (*hcf107-2*, *HCF107c*, *HCF107cPA* und WT), 15 µg (WT 1/2) bzw. 7.5 µg (WT 1/4) Membranproteine über SDS-PAGE (12 % Acrylamid, 6 M Harnstoff) aufgetrennt, mittels Western-Transfer auf Nitrocellulosemembran transferiert und in Folge mit Antisera gegen die Untereinheiten CP47 und PsbH des Photosystems II (PSII) sowie gegen die α -Untereinheit (AtpA) der plastidären ATP-Synthase (ATPase) immunodetektiert.

3. Herstellung Epitop-markierter Kontrolllinien: *hcf152* und *hcf155*

Mit Hilfe der Epitop-markierten HCF107-Fusionsproteine sollte die biochemische Aufreinigung möglicher interagierender Komponenten erfolgen, um Einblicke in die Funktionsweise des HCF107-Proteins zu erlangen. Daher war es erforderlich unspezifisch aufgereinigte Komponenten von tatsächlichen Interaktoren unterscheiden zu können. Aus diesem Grund sollten bei den anstehenden Experimenten nicht nur Wildtyp-Pflanzen sondern zusätzlich weitere Epitop-markierte *hcf*-Komplementanten als Kontrolle eingesetzt werden.

Hierzu wurden die *hcf*-Mutanten *hcf152* und *hcf155* ausgewählt. Beide Mutanten sind im homozygoten Zustand auf Erde angezogen letal und zeigen den typischen *hcf*-(Hoch-Chlorophyll-Fluoreszenz)-Phänotyp (Kroll *et al.* 2001; Meierhoff *et al.* 2003). Sowohl die Mutante *hcf152* als auch die Mutante *hcf155* konnten bereits erfolgreich durch Transformation mit der jeweiligen cDNA komplementiert werden.

Die Mutante *hcf152* ist wie die Mutante *hcf107* in der Prozessierung des plastidären *psbB*-Operon betroffen. Im Gegensatz zur Mutante *hcf107* wirkt sich jedoch der Defekt auf die Untereinheiten des Cytochrom b_6f -Komplexes aus und zwar ist die Mutante in der Prozessierung bzw. Stabilität translatierbarer *petB*-Transkripte gestört. Dies hat zur Folge, dass die Proteinspiegel aller Untereinheiten des Cytochrom b_6f -Komplexes stark reduziert sind. Das von der Mutation betroffene Gen *HCF152* kodiert ein 87 kDa großes PPR

(Pentatricopeptide repeat)-Protein mit spezifischer *petB*-RNA-Bindeaktivität und ist im Stroma des Chloroplasten lokalisiert (Meierhoff *et al.* 2003).

Die *hcf*-Mutante *hcf155* zeigt eine pleiotrope Schädigung des gesamten Photosyntheseapparates. So sind die Proteinspiegel der Untereinheiten aller vier photosynthetischen aktiven Komplexe der Thylakoidmembran sind auf bis zu 50 % des Wildtypniveaus reduziert. Ursache ist eine allgemeine Störung in der Biogenese der Thylakoidmembran. Das Gen *HCF155* kodiert ein 330 Aminosäuren großes, hydrophiles Protein ohne bekannte funktionelle Domäne und ist im Chloroplasten sowohl mit der Thylakoidmembran als auch mit der inneren Hüllmembran assoziiert (Kroll *et al.* 2001). Es wird spekuliert, dass HCF155 eine Komponente eines vesikulären Transportweges im Chloroplasten darstellt.

Die Herstellung, Transformation und Selektion der cDNA-Protein A- bzw. HA-Fusionskonstrukte erfolgte analog zu Kapitel III.2. Abbildung 11 gibt einen Überblick über die zur Transformation der Mutanten *hcf152-1* bzw. *hcf155* eingesetzten Komplementationskonstrukte.

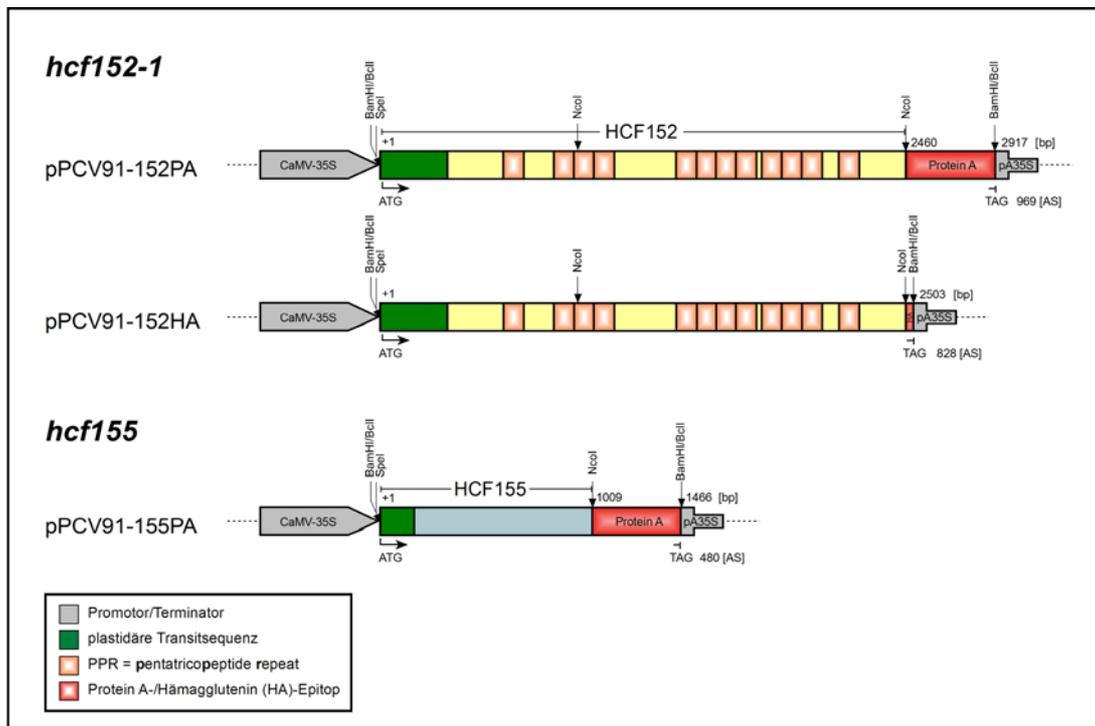


Abb. 11: Überblick über die zur Transformation der Mutanten *hcf152-1* und *hcf155* eingesetzten Komplementationskonstrukte. Dargestellt sind die jeweiligen Expressionskassetten der angegebenen Plasmide (links). Die für die Herstellung relevanten Restriktionsschnittstellen sind angegeben. CaMV-35S: Promotor, pA35S: Terminator des Cauliflower Mosaic Virus (CaMV).

Im Falle der Mutante *hcf152* konnte durch die Transformation des cDNA-Hämagglutinin-Fusionskonstruktes (pPCV91-152HA) eine vollständige Komplementation der Mutante erzielt werden. Insgesamt wurden vier unabhängig komplementierte Linien identifiziert (Bez. *HCF152cHA*). Im Gegensatz dazu konnte durch die Transformation des Protein A-Fusionskonstruktes (pPCV91-152PA) keine Komplementation des *hcf*-Phänotyps erzielt werden. Nach mehreren Transformationsansätzen wurden zwei transgene homozygote *hcf152*-Pflanzen identifiziert. Diese waren auf Erde jedoch nicht überlebensfähig oder bildeten kein bzw. nur wenig und außerdem keimungsunfähiges Saatgut. Somit wirkte sich in diesem Fall der Protein A-Teil des Fusionproteins, vermutlich aufgrund seiner Größe, störend auf die Funktionalität des Proteins aus.

Die Mutante *hcf155* wurde ausschließlich mit dem cDNA-Protein A-Fusionskonstrukt (pPCV91-155PA) transformiert. Dabei konnten zwei unabhängig komplementierte Linien gewonnen werden (Bez. *HCF155cPA*). Alle erzeugten Komplementanten sind im Gegensatz zu den ursprünglichen Mutanten auf Erde lebensfähig und zeigen keinen *hcf*-Phänotyp mehr (ohne Abbildung).

5. Der Wirkort des HCF107-Proteins

Wichtige Erkenntnisse zur Funktion unbekannter Protein können erlangt werden, wenn ihr Wirkort ermittelt wird. Erste Hinweise über den Wirkort eines Proteines innerhalb der Plastide können aus der Analyse der Primärstruktur gewonnen werden. So zeigten die Hydrophathieberechnungen der Aminosäuresequenz des Proteins HCF107, dass es sich um ein durchgehend hydrophiles Protein handelt, das keine größere hydrophobe Abschnitte aufweist (Abb. 12). Diese hydrophilen Eigenschaften des Proteins sowie das Fehlen einer Zielsequenz zur Integration in die Thylakoidmembran ließen vermuten, dass HCF107 kein integraler Bestandteil der Thylakoidmembran ist.

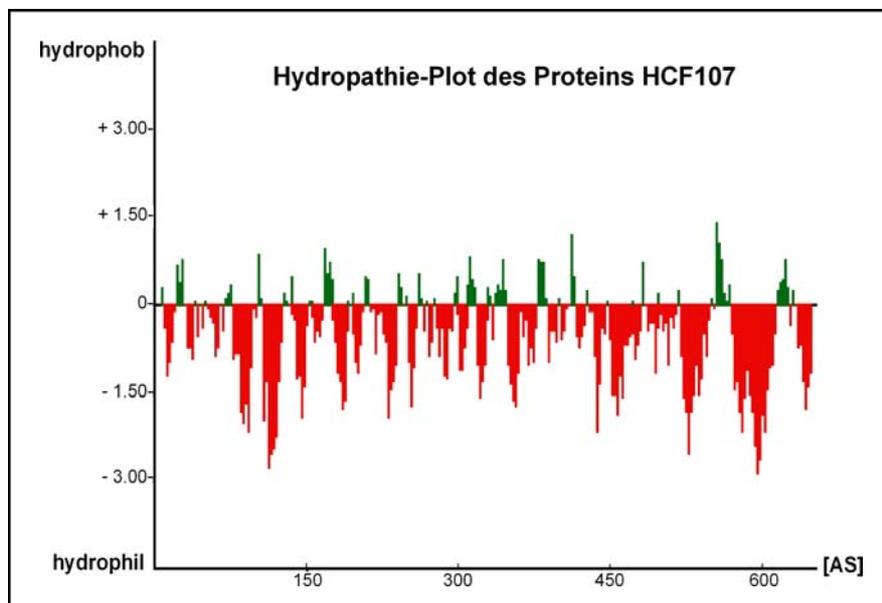


Abb. 12: Hydrophathie-Analyse des Proteins HCF107.

Um die Frage zu klären, ob HCF107 in löslicher Form im Stroma oder assoziiert mit den Chloroplastenmembranen vorliegt, wurden intakte Chloroplasten aus homozygoten *HCF107cPA*-Komplementanten über einen Percoll-Stufengradient isoliert, und nach der Lyse in Chloroplastenmembranen und lösliche Stromaproteine getrennt. Die so gewonnenen Fraktionen wurden im Anschluss mittels Immunoblotanalyse auf die Anwesenheit des HCF107-Protein A-Fusionsprotein (HCF107-PA) getestet. Hierbei wurden jeweils gleiche Mengen an Chlorophyll-Äquivalent eingesetzt. Abbildung 13 A zeigt ein sehr starkes Signal für HCF107-PA in der Chloroplastenmembranfraktion. Geringe Mengen des Proteins waren jedoch auch in der Stromafraktion nachweisbar. Wie der immunologische Nachweis von PsaD, einer Untereinheit des PS I belegt, war dieses Signal nicht auf eine Kontamination der

Stromafraktion mit Membranproteinen zurückzuführen. Das HCF107-Protein liegt damit im Wesentlichen membranassoziiert vor.

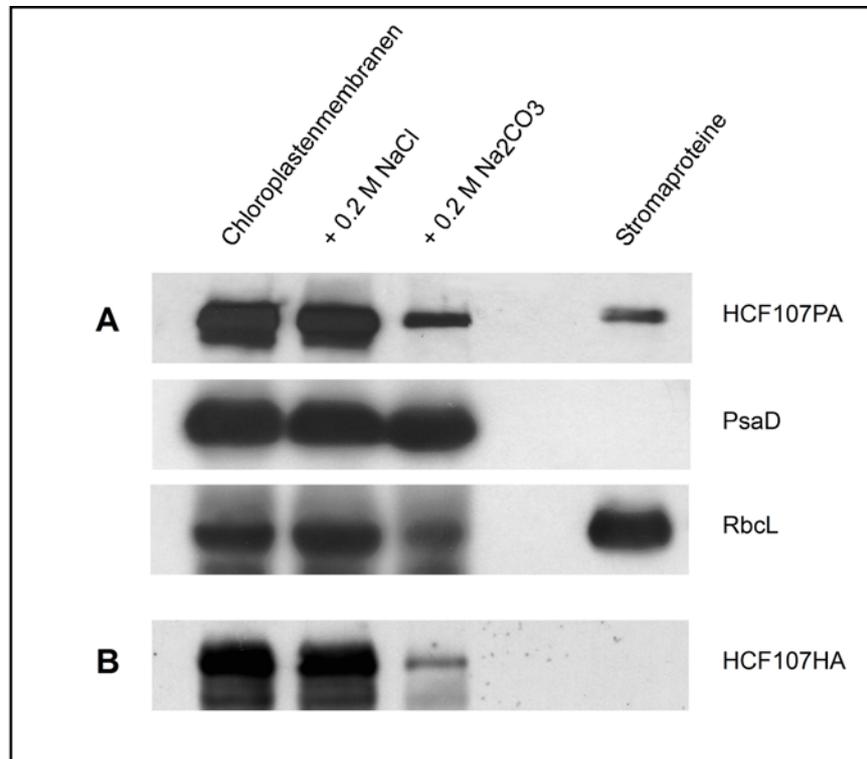


Abb.13: Lokalisation von HCF107 in Chloroplasten von *Arabidopsis thaliana*. Dargestellt sind repräsentative Ergebnisse aus insgesamt fünf unabhängigen Versuchen. **(A)** Intakte Chloroplasten wurden aus *HCF107cPA*-Komplementanten isoliert und in Chloroplastenmembranen und Stromaproteine fraktioniert. Um die Assoziation des HCF107-PA-Fusionsproteins mit den Chloroplastenmembranen zu studieren wurden, Aliquote der Membranfraktion mit 0.2 M NaCl und 0.2 M Na₂CO₃ gewaschen. Pro Spur wurden Proteine entsprechend 40 µg Chlorophyll mittels SDS-PAGE (10%Acrylamid, 6 M Harnstoff) aufgetrennt, auf Nirocellulosemembran transferiert und mit Antiseren gegen PsaD und RbcL immunodetektiert. Für den Nachweis des HCF107-PA-Fusionsproteins wurde Kaninchen-IgG-Peroxidase-Konjugat eingesetzt. **(B)** In einem Parallelexperiment wurde der Versuch mit *HCF107cHA*-Komplementanten wiederholt. Dabei wurden Proteine entsprechend 30 µg Chlorophyll eingesetzt. Zur Immunodetektion des HCF107-HA-Fusionsprotein wurde ein monoklonales HA (Hämagglutinin)-Antiserum verwendet.

Um die Stärke der Membranassoziation des HCF107 Proteins zu testen, wurden Aliquote der isolierten Chloroplastenmembranfraktion vor der Immunoblotanalyse verschiedenen Salzwaschungen unterzogen. Abbildungen 14 zeigt, dass die Waschung mit 200 mM NaCl nur ein sehr geringen bis keinen Einfluss auf die Membranassoziation des Proteins ausübt. Allenfalls Spuren wurden abgelöst und waren im Überstand detektierbar (ohne Abb). Anders verhielt es sich bei Waschung der Chloroplastenmembranen mit 200 mM Na₂CO₃. Natriumcarbonat wirkt nicht nur auf ionische Interaktionen sondern löst zusätzlich, in einem pH-abhängigen Prozeß, Membranvesikel auf (Fujiki *et al.* 1982). Dies führt zur Freisetzung

weiterer, peripherer Membranproteine. Integrale Membranproteine bleiben hingegen durch diese Behandlung unbeeinflusst.

In Abbildung 13 wird deutlich, dass nach der Behandlung mit Na_2CO_3 das HCF107-PA-Fusionsprotein nur noch in geringen Mengen mit der Chloroplastenmembran assoziiert vorlag, d.h. der größte Teil des Proteins wurde in den Überstand überführt worden. PsaD, ein integrales Protein der Thylakoidmembran, verblieb hingegen in der Membranfraktion. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass es sich bei HCF107 um ein peripher mit der Membran assoziiertes Protein handelt. Die Tatsache, dass sich HCF107 durch Waschung mit Natriumcarbonat von der Membran größtenteils ablösen ließ, spricht für eine Beteiligung hydrophober Wechselwirkungen an dieser Assoziation.

Um ausschließen zu können, dass die Membranassoziation von HCF107 auf das C-terminal angefügten Protein A Etikett zurückzuführen ist, wurde die Experimente zur Kontrolle mit Hämagglutinin-(HA)-ettkierten Komplementanten (*HCF107cHA*) wiederholt. Abb 13 B zeigt, dass auch das HA-ettkierte HCF107-Fusionsprotein assoziiert mit den Chloroplastenmembranen vorlag. Die durchgeführten Salzwassungen zeigten das gleiche Ergebnis wie zuvor. Somit ist die Membranassoziation unabhängig von dem für die C-terminale Ettkierung verwendeten Epitop und folglich auch nicht darauf zurückzuführen. Wie HCF107 mit der Membran assoziiert ist, ob direkt oder indirekt über weitere Proteine, als Bestandteil eines Komplexes, konnte anhand dieser Ergebnisse noch nicht festgestellt werden.

6. Nachweis und Größenbestimmung des HCF107-Komplexes

Viele, an der Prozessierung und Translation plastidärer Transkripte beteiligter, TPR- und PPR-Proteine sind Bestandteil höhermolekularer Komplexe (Fisk *et al.* 1999; Boudreau *et al.* 2000; Vaistij *et al.* 2000b). Im nächsten Schritt sollte daher untersucht werden, ob auch das TPR-Protein HCF107 im Chloroplasten assoziiert mit weiteren Proteine vorliegt oder sogar Bestandteil eines höhermolekularen Komplexes ist.

6.1 Auswahl geeigneter Solubilisierungsbedingungen

Aufgrund der durchgeführten Lokalisationsstudien war bekannt, dass HCF107 im Chloroplasten nahezu vollständig mit Membranen assoziiert ist. Für den Nachweis eines möglichen HCF107-Komplexes oder einzelner mit dem HCF107 Protein interagierender Komponenten musste daher zunächst eine möglichst schonende Solubilisierung des Proteins erfolgen. Hierzu wurde das nichtionische Detergenz Digitonin aus der Stoffgruppe der Digitalisglykoside gewählt. Es zählt zu den etabliertesten, milden und zur Solubilisierung

der Thylakoidmembran eingesetzten Detergenzien (Leto *et al.* 1985; Swiatek *et al.* 2001). Um zu testen, ob Digitonin für die Solubilisierung des HCF107-PA-Fusionsproteins geeignet ist wurden zunächst Solubilisierungsversuche im analytischen Maßstab durchgeführt.

Hierzu wurden lysierte Chloroplasten Protein A-etikettierter *hcf107*-Komplementanten (*HCF107cPA*) bei einer Chlorophyll-Konzentration von 1 mg/ml mit unterschiedlichen Digitonin-Konzentrationen (0.25-1.5%) für 30 Minuten auf Eis inkubiert und die solubilisierten Proteine wurden durch eine Zentrifugation der Ansätze bei 16000 g für 20 Minuten gewonnen. Zum Vergleich wurde noch zwei weitere Detergenzien CHAPS (Cholamidopropyl-dimethylammonio-1-propansulfonat), ein zwitterionisches Detergenz, und n-Octyl- β -D-glucopyranosid, ein weiteres anionisches Detergenz, eingesetzt. Abbildungen 14 zeigt die Ergebnisse der durchgeführten Solubilisierungsversuche.

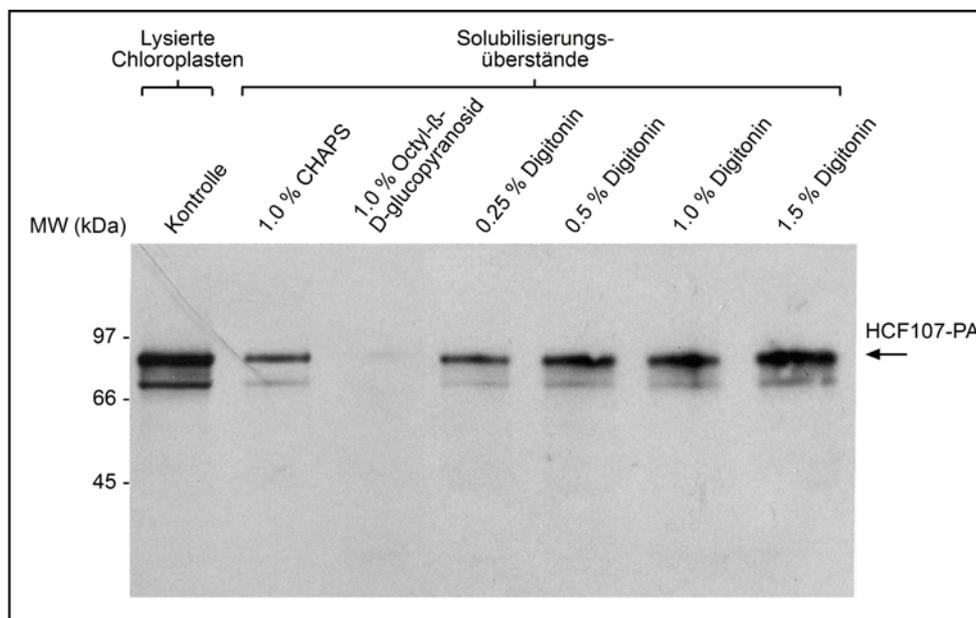


Abb. 14: Auswahl geeigneter Detergenzien zur Solubilisierung des HCF107-Proteins. Lysierte Chloroplasten aus *HCF107cPA*-Komplementanten wurden mit den angegebenen Detergenzien und Konzentrationen bei einer Chlorophyllkonzentration von 1 mg/ml solubilisiert. Pro Bahn wurden jeweils Solubilisierungsüberstände bzw. lysierte Chloroplasten dem Äquivalent von 35 μ g Chlorophyll entsprechend über SDS-PAGE (10 % Acrylamid, 6 M Harnstoff) aufgetrennt und mittels Immunoblotanalyse auf die Solubilisierung des HCF107-PA-Fusionsproteins getestet.

In der Immunoblot-Analyse ist deutlich zu erkennen, dass bereits bei einer Digitonin-Konzentration von 0.25 % 10-20 % des HCF107-PA Fusionproteins in den Überstand überführt wurden. Eine Erhöhung der Digitonin-Konzentration auf 0.5 % steigerte den Anteil an solubilisierten Protein auf etwa 40-50 %. Die weitere schrittweise Erhöhung der Digitonin-Konzentration führte zu einer kontinuierlichen Zunahme des solubilisierten Fusionsproteins

auf bis zu 80 % des eingesetzten Proteins bei einer Digitoninkonzentration von 1.5 % (Abb. 14). Der Einsatz von 1 % n-Octyl- β -D-glucopyranosid und 1 % CHAPS zeigte nur eine sehr geringe bzw. schwache Wirkung auf die Solubilisierung des HCF107-PA-Fusionsproteins, die in etwa der Wirkung von 0.25 % Digitonin entsprach. Auffällig ist, dass bei allen Proben in der Immunoblot-Analyse eine zusätzliche Bande unterhalb des eigentlichen Signals zu erkennen ist. Diese ist vermutlich auf einen proteolytischen Abbau des Proteins zurückzuführen.

Die Ergebnisse der durchgeführten Solubilisierungsversuche zeigen, dass Digitonin das geeignete Detergenz zur Solubilisierung des HCF107 Proteins ist. Dabei kann für den angestrebten Nachweis, bzw. die Aufreinigung möglicher interagierender Proteine, von entscheidender Bedeutung sein, dass es sich hierbei um ein sehr mildes Detergenz handelt das trotzdem schon in geringen Konzentrationen (0.5-1.5 % Digitonin) einen großen Teil des HCF107-PA-Fusionsprotein in den Überstand überführen kann.

6.2. Auftrennung Digitonin-solubilisierter Chloroplastenproteine mittels Blue-Native-Gelelektrophorese

Im nächsten Schritt sollte mit Hilfe der Blue-Native- Polyacrylamidgelelektrophorese (BN-PAGE) der Nachweis und gegebenenfalls die Größenbestimmung des postulierten HCF107-Proteinkomplexes erfolgen. Die BN-PAGE ist eine etablierte Methode zur Auftrennung solubilisierter Thylakoidmembranen und erlaubt eine Auftrennung der Proteinkomplexe nach ihrer Micellengröße (Schägger *et al.* 1994) Zu diesem Zweck wurden Chloroplasten aus *HCF107cPA*-Komplementanten isoliert, lysiert und in 1 % Digitonin solubilisiert. Der Solubilisierungsüberstand wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen an n-Dodecyl- β -D-maltosid versetzt (0.0-0.8 %) und über BN-PAGE aufgetrennt. Abbildung 15 zeigt die Ergebnisse der im Anschluss an die BN-PAGE durchgeführten Immunoblot-Analysen. Bei keiner der analysierten Proben war ein spezifisches Signal, weder für einen höhermolekularen HCF107-Komplex noch für das monomere HCF107-Protein A-Fusionsprotein, erkennbar. Zwar zeigte sich nach 15 minütiger Exposition bei den Proben, die mit 0.2, 0.4 und 0.8 % Dodecylmaltosid versetzt wurden, ein schwaches Signal auf der Höhe von etwa 230 kDa, dieses war jedoch auch bei der entsprechenden Wildtyp-Kontrolle deutlich sichtbar (Abb. 15). Es handelte sich hierbei vermutlich um den Cytochrom b_6 -Komplex. Das Signal ist auf eine Reaktion (Peroxidaseaktivität) der Häm-Gruppen des Cytochrom f und Cytochrom b_6 mit dem verwendeten ECL-Nachweisreagenz zurückzuführen (Lennartz *et al.* 2001). Hingegen konnten in den als Positiv-Kontrolle aufgetragenen Extrakten der Komplementante *HCF153cPA* das monomere HCF153-Protein A-Fusionsprotein mit einer Größe von etwa 30 kDa eindeutig identifiziert werden. Folglich ist es

zwar prinzipiell möglich, über BN-PAGE die Größe von solubilisierten Protein A-Fusionsproteinen zu bestimmen, für HCF107 ist dies jedoch nicht der Fall. Somit ließ sich auch die Frage, ob HCF107 als Proteinkomplex vorliegt, mit Hilfe des verwendeten experimentellen Ansatzes der BN-PAGE nicht beantworten.

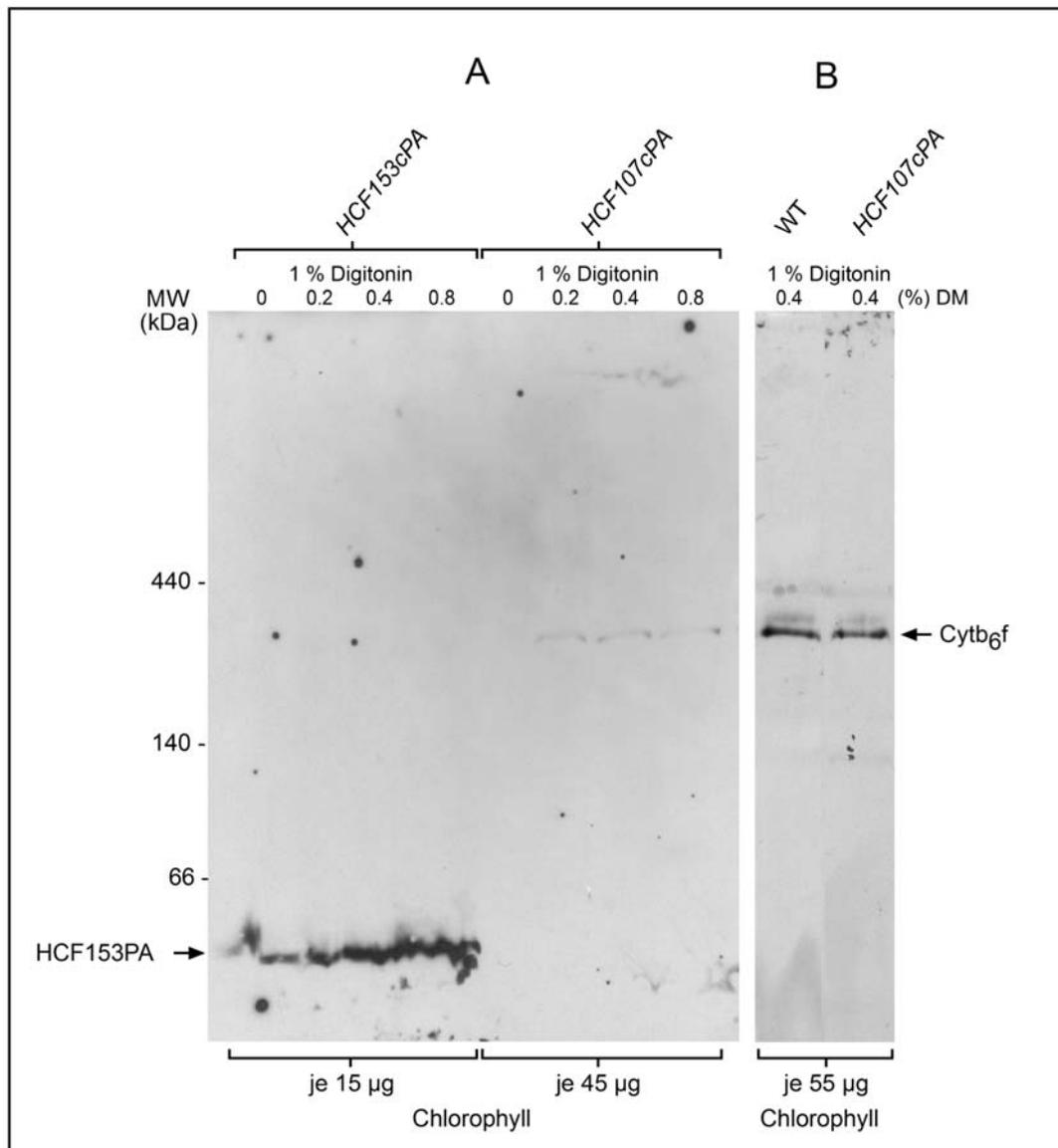


Abb. 15: Blue-Native-Gelelektrophorese mit Digitonin-solubilierten Chloroplastenfraktionen der Komplementanten *HCF107cPA*, *HCF153cPA* und Wildtyp-Pflanzen. Lysierte Chloroplasten wurden mit 1.0 % (w/v) Digitonin solubilisiert, über Blue-Nativ-Gelelektrophorese aufgetrennt, und Nitrocellulose transferiert. Zur Detektion der Protein A-Fusionsproteine wurde Kaninchen IgG-Peroxidase-Konjugat verwendet. **(A)** Die Solubilisierungsüberstände wurden vor der Elektrophorese wahlweise auf eine n-Dodecyl-β-D-maltosid (DM)-Konzentration von 0, 0.2, 0.4 bzw. 0.8 % (w/v) eingestellt. Es wurden jeweils das Äquivalent von 15 (*HCF153cPA*) bzw. 45 µg Chlorophyll (*HCF107cPA*) für die Blue-Nativ-Gelelektrophorese eingesetzt. Die Expositionsdauer des Filters betrug 15 Minuten. **(B)** Die Solubilisierungsüberstände wurden auf eine n-Dodecyl-β-D-maltosid-Konzentration von 0.4 % (w/v) eingestellt. Es wurde jeweils das Äquivalent von 55 µg Chlorophyll gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Expositionsdauer des Filter betrug 45 Minuten.

6.2 Zentrifugation Digitonin-solubilisierter Chloroplastenproteine im Saccharosedichtegradienten

Eine alternative Methode zur Auftrennung solubilisierter Proteinkomplexe aus Thylakoidmembranen stellt die Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation dar (Van Wijk *et al.* 1996). Die Methode beruht auf dem Prinzip der Zonensedimentation und erlaubt ebenfalls eine Auftrennung der solubilisierten Proteine nach ihrer Micellengröße. Die Digitonin/n-Dodecyl- β -D-maltosid-solubilierte Chloroplasten aus *HCF107cPA*-Komplementanten wurden deshalb über einen lineare Saccharose-Gradienten aufgetrennt und die im Anschluss geernteten Fraktionen mittels Immunoblot-Analyse auf die Anwesenheit des HCF107-Protein A-Fusionsprotein und repräsentativer Untereinheiten ausgewählter Thylakoidmembrankomplexe getestet (Abb. 16). Die Identifizierung der Thylakoidmembrankomplexe erfolgte durch den Vergleich der Verteilungsmuster der jeweiligen Untereinheiten mit den Ergebnissen aus Müller & Eichacker (1999). Zusätzlich wurden in einer Kontrollzentrifugation definierte Marker-Komplexe zur Größenabschätzung aufgetrennt (ohne Abbildung). So konnten vollständig assemblierte Komplexe des Photosystems I und II, sowie des Cytochrom b_6f -Komplex in den höhermolekularen Fraktionen nachgewiesen werden. Anhand des PsaA/B Verteilungsmuster konnte der PSI-Kernkomplex hauptsächlich in der Fraktion 9 lokalisiert werden. Aufgrund der Größe handelt es sich hierbei um die aktive dimere mit dem Lichtsammelkomplex des Photosystems I (LHCI) assoziierte, Form. Für die Untereinheiten des Photosystems II PsbA (D1) und PsbB (CP47) zeigen sich wiederum zwei Verteilungsmaxima. Demnach enthält Fraktion 7 eine monomere Form des PSII-Kernkomplexes und Fraktion 10 das entsprechende PSII-Kernkomplex-Dimer. Aufgrund des Verteilungsmusters seiner Untereinheit PetD (Cytb₆) ist der Cytochrom b_6f -Komplex in den Fraktionen 5, 6 und 7 lokalisiert. Dabei handelt es sich in Fraktion 7 vermutlich um die dimere Form und in Fraktion 5 um die monomere Form des Komplexes.

Das HCF107-Protein A-Fusionsprotein verteilte sich laut Immunoblot-Analyse über einen weiten Bereich des Saccharose-Gradienten. Der Großteil des Proteins war in den Fraktionen 4 bis 7 im Größenbereich von 100 bis 240 kDa lokalisiert, mit einem Schwerpunkt in Fraktion 5. Signifikante Mengen des Proteins zeigten jedoch eine Verschiebung in die höhermolekularen Fraktionen 10 und 11, was einem Molekulargewicht von 600-800 kDa entspricht. Demzufolge lag unter den angewendeten Solubilisierungsbedingungen HCF107 zu einem Großteil assoziiert mit weiteren Komponenten vor. Nur in den Fraktionen 3 und 4 war das vermutlich monomere Protein mit einer Größe von 83 kDa nachweisbar.

Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass HCF107 Bestandteil eines höhermolekularen Komplexes ist. Das Molekulargewicht des nachgewiesenen Komplexes zeigte sich jedoch unter den verwendeten experimentellen Bedingungen sehr uneinheitlich

und variiert zwischen minimal 100 und maximal 800 kDa. Dabei lassen sich zwei eindeutige Verteilungmaxima, im niedermolekularen Bereich zwischen 120 und 220 kDa sowie im höhermolekularen Bereich zwischen etwa 600 und 800 kDa, feststellen.

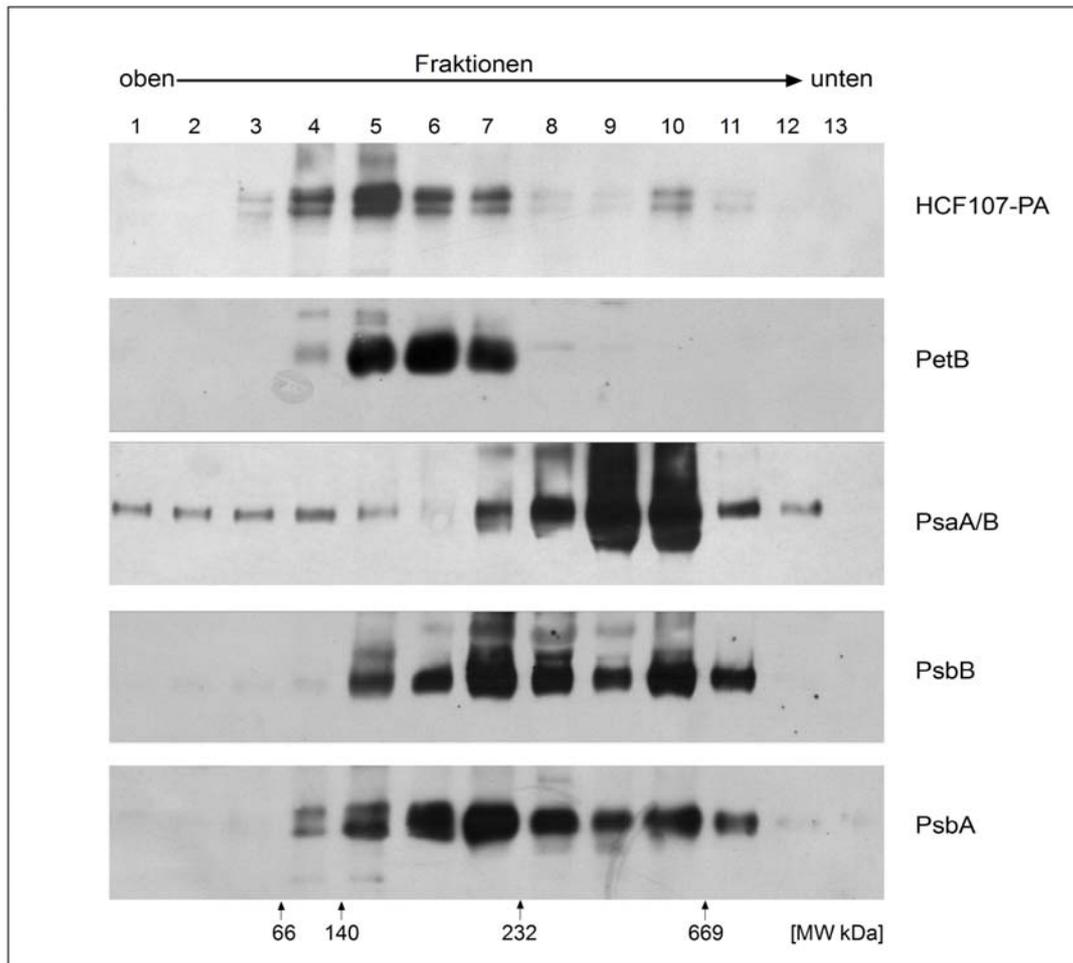


Abb. 16: Lokalisierung von HCF107-PA im linearen Saccharosegradienten. Dargestellt sind repräsentative Ergebnisse aus insgesamt vier Versuchen. Chloroplasten wurden aus *HCF107cPA*-Komplementanten isoliert, lysiert und mit 1.5 % (w/v) Digitonin solubilisiert. 500 μ l des Solubilisierungsüberstand wurde mit n-Dodecyl- β -maltosid ad 0.5% (w/v) versetzt und die solubilisierten Proteinkomplexe durch Dichtezentrifugation im linearen Saccharosegradienten aufgetrennt. 13 Fraktionen zu je 1 ml wurden von unten nach oben geerntet, durch TCA-Präzipitation aufkonzentriert und über eine SDS-PAGE (10% Acrylamid, 6 M Harnstoff) aufgetrennt. Im Anschluß wurden die Fraktionen mittels Immuntransferanalyse auf die Anwesenheiten des HCF107-PA-Fusionsproteins, der Untereinheiten PetB des Cytochrom *b6f*-Komplexes, PsaA/B des Photosystem I und PsbA, PsbB des Photosystem II getestet. Die Verteilung der angegebenen Markerkomplexe wurde durch eine parallel durchgeführte Dichtezentrifugation definierter Markerkomplexe im linearen Saccharosegradienten ermittelt. Die Verteilungmaxima der Markerkomplexe in den einzelnen Fraktionen wurde durch SDS-PAGE (10% Acrylamid, 6 M Harnstoff) und anschließender Coomassie-Färbung bestimmt (ohne Abbildung).

7. Affinitätschromatographische Versuche zur Ermittlung von HCF107-Interaktoren

7.1 Analytische IgG-Affinitätschromatographie - Auswahl geeigneter Elutionsbedingungen

Mit Hilfe der Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation konnte erstmals nachgewiesen werden, dass HCF107 tatsächlich wie vermutet Bestandteil eines höhermolekularen Komplexes ist. Um diesen Komplex zu isolieren und entsprechende Interaktoren zu identifizieren wurden in Folge affinitätschromatographische Experimente durchgeführt. In einem Vorversuch wurde zunächst getestet, ob unter den vorliegenden Solubilisierungsbedingungen eine Aufreinigung des HCF107 Fusionsproteins über das C-terminal angefügte Protein A-Etikett möglich ist. Zu diesem Zweck wurden wie zuvor Chloroplasten aus *HCF107cPA*-Komplementaten mit Digitonin solubilisiert und mittels IgG-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Weiterhin sollten geeignete Bedingungen für die Elution des gebundenen Fusionsproteins ermittelt werden. Aus diesem Grund wurden vier unterschiedliche Puffer zur Elution eingesetzt. Die Ergebnisse der Immunoblot-Analyse (Abb. 17). belegen, dass die Aufreinigung des Fusionsproteins mittels IgG-Affinitätschromatographie prinzipiell funktioniert. In allen Eluaten konnte das HCF107-PA-Fusionsprotein detektiert werden. Dabei zeigten die vier verwendeten Elutionsbedingungen zum Teil sehr unterschiedliche Resultate (Abb. 17). Die Verwendung von Glycin und Harnstoff hatte nur eine sehr geringe bis gar keine Wirkung. Nur Spuren des Fusionsproteins waren im Falle von Glycin im Westernblot detektierbar. Im Gegensatz dazu führte der Einsatz von NaSCN und SDS zur vollständigen Elution des gebundenen HCF107-Fusionsproteins. In beiden Fällen waren die Eluate jedoch durch abgelöste Immunoglobuline (IgGs) verunreinigt, wobei die schwere IgG-Kette deutliche Kreuzreaktionen mit dem verwendeten Antiserum zeigte. Die charakteristischen IgG-Banden waren jedoch auch bei der Elution mit Glycin im silbergefärbten SDS-PAGE deutlich erkennbar (ohne Abb.). Dies bedeutet, dass die verwendete IgG-Sepharose (IgG-Sepharose 6 Fast Flow, Amersham Biosciences) zum Teil instabil war und sich dadurch IgGs von der Matrix ablösten und sich in den Eluaten wieder fanden.

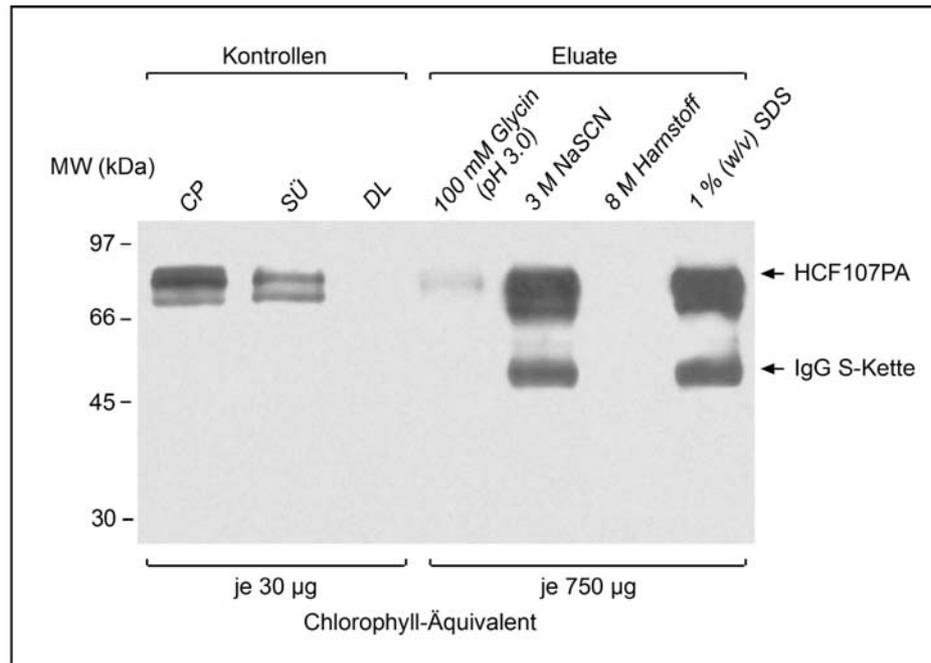


Abb. 17: Auswahl geeigneter Elutionsbedingungen zur Aufreinigung des HCF107-PA-Fusionsproteins und möglicher interagierender Komponenten mittels IgG-Affinitätschromatographie. Das Äquivalent von 3 mg Chlorophyll an lysierte Chloroplasten aus *HCF107cPA*-Komplementanten wurden, wie unter Material und Methoden mit 0.5% (w/v) Digitonin solubilisiert und mittels IgG-Sepharose aufgereinigt. Zum Austesten geeigneter Elutionsbedingungen wurden der Ansatz auf vier Protionen verteilt und mit dem jeweils angegebenen Elutionspuffers eluiert. Die Eluate wurden durch TCA-Präzipitation aufkonzentriert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Im Anschluß wurden die Proteine auf Nitrocellulose transferiert und mit einem Antiserum gegen Protein A immunodetektiert. Zum Vergleich wurden Aliquots der lysierten Chloroplasten (CP), des Solubilisierungsüberstandes (SÜ) und der Duchlaufraction (DL) mit aufgetragen.

7.2 Präparative IgG-Affinitätschromatographie zur Ermittlung von interagierenden Proteinen

Für die folgenden Aufreinigungen im präparativen Maßstab wurde SDS zur Elution der gebundenen Proteine gewählt. Um unspezifisch aufgereinigte Komponenten von tatsächlichen Interaktoren unterscheiden zu können wurden zum direkten Vergleich parallel Aufreinigungen mit den Protein A-ettikettierten Komplementanten *HCF155cPA* und *HCF153cPA* durchgeführt. Abbildung 18 zeigt die über SDS-PAGE aufgetrennten Eluate nach anschließender Färbung der Proteine mit dem Farbstoff Coomassie. In allen untersuchten Eluaten fanden sich die charakteristischen IgG-Banden wieder. Daneben war weder im Falle der Komplementante *HCF107cPA* noch bei der Kontrolle *HCF155cPA* das jeweilige Fusionprotein als eindeutige Bande erkennbar (Abb. 18). Nur im Falle der Komplementante *HCF153cPA* war im Gel vermutlich das entsprechende Fusionsprotein mit einer Größe von etwa 30 kDa oberhalb der leichten IgG-Kette sichtbar. Jedoch zeigten sich auch hier keine weiteren spezifischen Banden, die auf eine Aufreinigung interagierender

Proteine hindeuten würden. Folglich war der Ansatz der IgG-Affinitätschromatographie, zumindest unter den gewählten Bedingungen und den verwendeten Materialien, nicht geeignet, die im Saccharose-Dichtegradienten offensichtliche Assoziation von HCF107 mit weiteren Proteinen zu bestätigen bzw. die entsprechenden Interaktionspartner zu identifizieren.

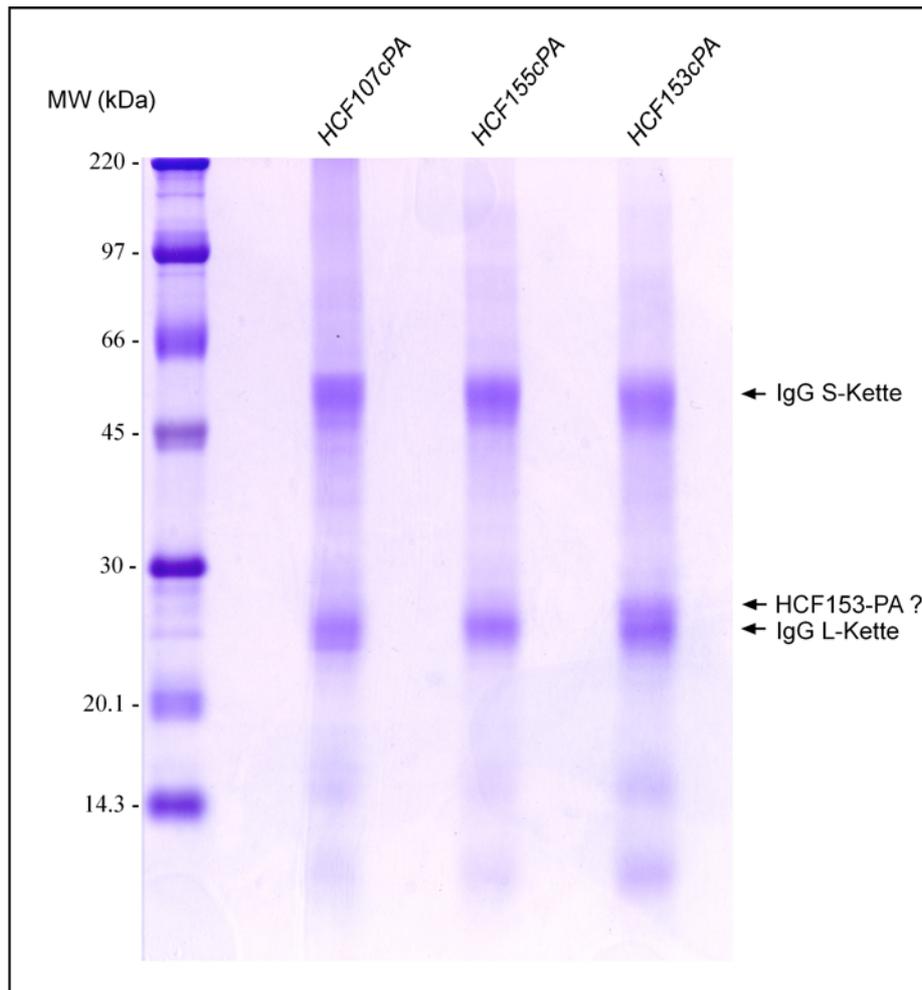


Abb. 18: Vergleichende IgG-Affinitätschromatographie mit Solubilisierungsüberständen der Komplementanten *HCF107cPA*, *HCF155cPA* und *HCF153cPA*. Solubilisierung und IgG-Affinitätschromatographie wurden wie unter Material und Methoden beschrieben durchgeführt. Es wurden jeweils das Äquivalent von 2 mg Chlorophyll an lysierten Chloroplasten zur Solubilisierung mit 0.5% (w/v) Digitonin eingesetzt. Als Elutionspuffer wurde 1 % (w/v) SDS verwendet. Gezeigt werden Ausschnitte aus Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamidgelen mit den jeweils eluierten Proteinen der drei untersuchten Komplementanten.

7.3 RT-basierter Nachweis plastidärer Transkripte

Da die Mutante *hcf107* Defekte in der Prozessierung und/oder Stabilisierung der 5'-prozessierten *psbH*-Transkripte sowie in der Translation von *psbB* des plastidären *psbB*-Operons aufweist, ist es denkbar, dass HCF107 als Bestandteil eines höhermolekularen Komplexes assoziiert mit Transkripten des *psbB*-Operon vorliegt. Zur Klärung dieser Frage sollte in weiteren Experimenten die mittels IgG-Affinitätschromatographie aus *HCF107cPA*-Komplementanten isolierten Eluate mittels RT-PCR Ansatzes auf die Anwesenheit bestimmter plastidärer Transkripte getestet werden. Hierzu war es notwendig die gewonnenen Eluate mittels Phenol-/Chloroform-Extraktion aufzureinigen und die in der wässrigen Phase vermutete RNA zu präzipitieren. Unter Verwendung von spezifischen Primern wurden zunächst die RNAs gezielt in einzelsträngige cDNA umgeschrieben und schließlich in der darauf folgenden Polymerasekettenreaktion amplifiziert. Untersucht wurden neben den Transkripte des *psbB*-Operon (*psbB*, *psbH*, *petB* und *petD*) zusätzlich weitere Transkripte anderer plastidärer Operons. Abbildung 19 A gibt einen Überblick über die getesteten Transkripte (rot). Als weitere Kontrolle wurden die Experimente parallel mit Wildtyp-Pflanzen durchgeführt. Aufgrund der IgG-Affinitätschromatographie sollten in den RT-PCR-Ansätzen nur solche Transkripte amplifiziert werden, die zuvor mit HCF107 im Komplex vorlagen. Da in ersten Versuchen auch im Eluat von Wildtyp-Pflanzen alle getesteten Transkripte erfolgreich nachgewiesen werden konnten, wurde vermutet, dass eine Kontamination mit plastidärer DNA die Ursache war. Dennoch konnten auch nach der DNase-Behandlung noch in allen Proben, egal ob aus Wildtyp-Pflanzen oder *HCF107cPA*-Komplementanten, die Transkripte *psbH*, *psbE*, *petB* und *petD*, wenn auch zum Teil in sehr geringen Mengen, eindeutig nachgewiesen werden (ohne Abb.). Dies deutet darauf hin das neben DNA auch RNA unspezifisch an die bei der Aufreinigung verwendete IgG-Sepharose gebunden hat und sich so letztendlich in den Eluaten wieder fand. Um trotz dieser Problematik mögliche Unterschiede in den Transkriptmengen zwischen *HCF107cPA*-Komplementante und der Wildtyp-Kontrolle aufzudecken wurde in Folge ein semi-quantitativer Ansatz gewählt. Hierzu wurden jeweils nach 15, 20 und 25 Zyklen der Polymerasekettenreaktion Proben entnommen und diese schließlich mittels Agarosegelelektrophorese in Gegenwart des Farbstoffes Ethidiumbromid analysiert (Abb. 19).

Wiederum konnten bei allen untersuchten Präparationen nach 25 Zyklen jeweils geringe Mengen der Transkripte *psbE*, *petB* und *petD* nachgewiesen werden. Hierbei zeigen sich jedoch zwischen den einzelnen Präparationen keine signifikanten Unterschiede in den Produktmengen (Abb. 19). Im Gegensatz dazu zeigen sich Unterschiede zwischen Wildtyp-Kontrolle und *HCF107cPA*-Komplementante beim RT-PCR basierten Nachweis des *psbH*-Transkriptes. Zum einen sind die Produktmengen, nach Abschluss der Polymerasereaktion

(25 Zyklen) im Falle der Komplementante im Vergleich zum Wildtyp, erhöht. Zum andern ist bereits nach 20 Zyklen ein PCR-Produkt erkennbar (Abb. 19). Demzufolge sind die bei der IgG-Affinitätschromatographie gewonnen Eluate im Falle der Komplementante *HCF107cPA* in einem erhöhten Maße mit *psbH*-Transkripten angereichert. Dies deutet auf eine spezifische Ko-Immunopräzipitation von *psbH*-Transkripten hin.

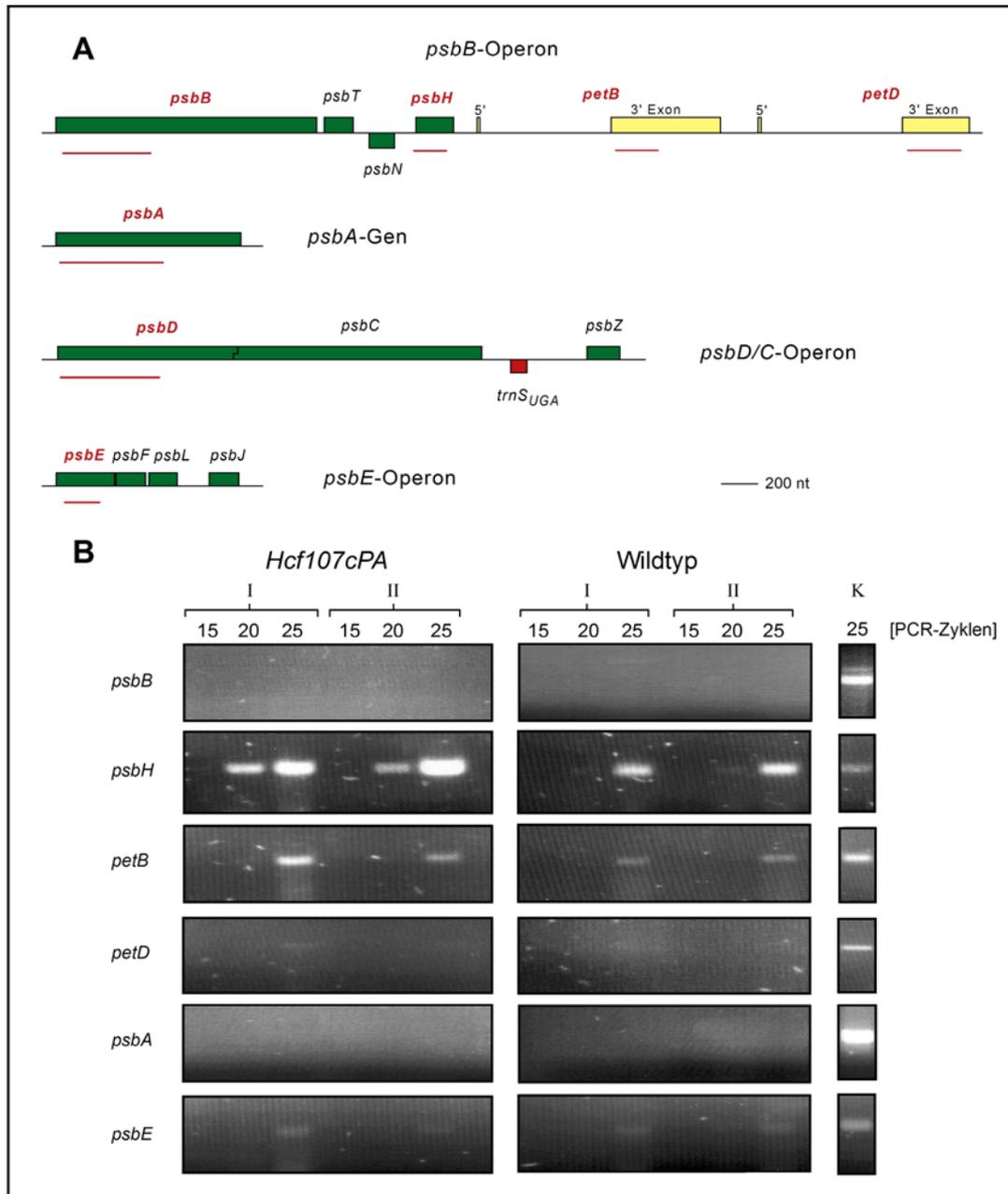


Abb. 19: RT-PCR-basierter Nachweis ko-immunopräzipitierter plastidärer Transkripte. Lysierte Chloroplasten aus *HCF107cPA*-Komplementanten wurden wie unter Material und Methoden beschrieben mit 1.5 % (w/v) Digitonin solubilisiert, das HCF107-PA-Fusionsprotein mittels IgG-Affinitätschromatographie aufgereinigt und die im Eluat befindlichen plastidäre Transkripte mittels RT-PCR nachgewiesen. Zur Kontrolle wurde das Experiment parallel mit Wildtyppflanzen durchgeführt. Gezeigt werden: (A) Überblick über die getesteten Transkripte (rot) der verschiedenen Operons. Angegeben sind Lage und Größe der mittels RT-PCR amplifizierten Bereiche (rote Balken). (B) Analyse der durchgeführten RT-PCR-Ansätze mittels Agoresegelelektrophorese. Gezeigt werden repräsentative Ergebnisse aus insgesamt vier unabhängigen Experimenten. Als Positiv-Kontrolle (K) der Reversen Transkription und der anschließenden Polymerasekettenreaktion wurden 100 ng Wildtyp-Gesamt-RNA eingesetzt und parallel mitbehandelt. (I) und (II): unabhängige Präparationen

IV. Diskussion

1. Nukleäre Mutanten geben Einblicke in die Wirkungsweise posttranskriptioneller Regulationsmechanismen

In Grünalgen und höheren Pflanzen ist im Verlaufe der Chloroplastenbiogenese die posttranskriptionelle Regulation der plastidären Genexpression von entscheidender Bedeutung. Dabei sind zahlreiche nukleär kodierte Faktoren beteiligt, die in die Prozessierung, Stabilisierung und Translation der plastidären Transkripte eingreifen. Eine Vielzahl nukleärer Mutanten aus *Arabidopsis thaliana*, Mais (*Zea mays*) und *Chlamydomonas reinhardtii* geben Einblicke in die Wirkungsweise dieser Faktoren. Dabei kann man zwischen allgemeinen und spezifisch wirkenden Biogenesefaktoren unterscheiden. So ist z.B. die Mutante *crp3* aus *C. reinhardtii* in der 3'-Prozessierung zahlreicher plastidärer Transkripte gestört und vermutlich Bestandteil einer allgemeinen 3'-Prozessierungsmaschinerie (Levy *et al.* 1997; Levy *et al.* 1999). Daneben existieren zahlreiche Mutanten, die spezifisch in der Prozessierung oder Translation eines oder mehrerer Transkripten betroffen sind. Hierzu zählen unter anderem die Mutanten *nac2*, *tbc2* und *mbb1* (222E) aus *C. reinhardtii* sowie die Mutante *crp1* aus Mais (Barkan *et al.* 1994; Nickelsen *et al.* 1994; Vaistij *et al.* 2000a; Auchincloss *et al.* 2002). Diese Mutanten haben gemeinsam, dass der Wirkort des von der Mutation betroffenen Gens in der 5'-untranslatierten Region der betroffenen Transkripte zu suchen ist. So sind die Gene *Nac2* und *Tbc2* essentiell für die Stabilisierung oder Translation der *psbD* bzw. *psbC* mRNA. Die Gene *Crp1* und *Mbb1* werden jeweils für die 5'-Prozessierung oder Translation zweier unterschiedlicher Transkripte benötigt. So zeigt die Mutante *crp1* einen Defekt in der 5'-Prozessierung der *petD*-mRNA des *psbB*-Operons. Außerhalb dieses Operons ist die Mutante zusätzlich und vermutlich unabhängig davon in der Translation der *petA*-mRNA gestört. Die Mutante *mbb1* weist Defekte in der Prozessierung zweier Transkripte innerhalb einer Transkriptionseinheit auf. So ist sie zum einen in der 5'-Prozessierung/Stabilisierung der dicistronischen *psbB*-Transkripte der *psbB/T/H*-Transkriptionseinheit betroffen. Zum anderen findet in der Mutante keine Akkumulation der monocistronischen *psbH*-Transkripte desselben Operon statt.

Die hier aufgeführten Mutanten haben gemeinsam, dass die betroffenen Gene allesamt für plastidäre Proteine mit superhelikalen Strukturen kodieren, denen Funktionen in der Wechselwirkung mit anderen Proteinen oder RNA zugeschrieben werden. *Nac2* und *Mbb1* gehören zur Familie der TPR-(tetratricopeptide repeat)-Proteine (Boudreau *et al.* 2000; Vaistij *et al.* 2000b). *CRP1* besitzt eine PPR-Domäne (PPR = pentatricopeptide repeat), einem der TPR verwandten Strukturmotiv, das sich prinzipiell nur in der Größe der repetitiven Einheit von der TPR-Domäne unterscheidet (Fisk *et al.* 1999; Small and Peeters

2000). Tbc2 besitzt ebenfalls eine Domäne mit helikalen Strukturen. Dieser liegt ein stark degeneriertes repetitives Sequenzmotif aus 38-40 Aminosäuren zu Grunde, das Ähnlichkeiten zur PPR-Domäne aufweist (Auchincloss *et al.* 2002). Des Weiteren sind sämtliche der hier aufgeführten Faktoren Bestandteil höhermolekularer Proteinkomplexe, die in den Chloroplasten zum Teil assoziiert mit RNA vorliegen (Fisk *et al.* 1999; Boudreau *et al.* 2000; Vaistij *et al.* 2000b; Auchincloss *et al.* 2002).

2. Die Mutante *hcf107* aus *Arabidopsis thaliana*

Die PSII-Mutante *hcf107-1* (Meurer *et al.* 1996aa) und ihr Allel *hcf107-2* (Felder *et al.* 2001) aus *A. thaliana* lassen sich nahtlos in diesen Kontext einordnen. Wie die Mutante *crp1* aus Mais zeigten die Mutanten Störungen im Prozessierungsmuster des *psbB*-Operons. So fehlen alle durch endonukleolytischen Spaltung im 5'-untranslatierten Bereich der RNA erzeugten translationskompetenten *psbH*-Transkripte. Weiterhin zeigt die Mutante einen Defekt auf Ebene der *psbB*-Translation. Das in den beiden Allelen der Mutante *hcf107* betroffene Gen wurde mittels markergestützter Positionsklonierung isoliert und kodiert für ein 652 Aminosäure großes TPR-Protein mit plasitdärer Transitsequenz. Das kodierte Protein HCF107 ist ortholog zu MBB1 aus *Chlamydomonas* und zu zwei erst kürzlich identifizierten Proteinen aus Reis. Des Weiteren zeigt das Protein Homologien zur zahlreichen anderen TPR-Proteinen mit unterschiedlichsten Funktionen. Die Homologien sind jedoch in allen Fällen weitgehend auf die TPR-Domäne des Proteins begrenzt (Felder *et al.* 2001).

Im Zuge dieser Arbeit wurden zunächst mittels Northernanalyse die Expression des Gens *HCF107* in den beiden Allelen der Mutante untersucht (Abb. 4). Mit der zuvor isolierten cDNA als Sonde konnte in der EMS-Mutante *hcf107-1* sowie im Wildtyp jeweils ein Transkript von etwa 2.2 kb Größe detektiert werden. Dabei zeigten sich keine Unterschiede in den Transkriptspiegeln zwischen der EMS-Mutante *hcf107-1* und dem Wildtyp. Im Unterschied dazu waren die *HCF107*-Transkriptspiegel in der T-DNA-Mutante auf unter 50 % des Wildtypniveaus reduziert. Daneben traten, wie bereits aufgrund der Sequenzierung des entsprechenden RT-PCR-Produktes bekannt war, Unterschiede in der Transkriptgröße auf. So war das in der T-DNA-Mutante *hcf107-2* detektierte Transkript etwa 200 Nukleotide größer als im Wildtyp und der EMS-Mutante *hcf107-1* und ist die Folge einer durch die T-DNA-Mutagenese hervorgerufenen Sequenzdeletion/-insertion an der Grenze zwischen dem dritten Exon und Intron des Gens. Im Detail betrachtet wurde eine Sequenz aus 17 Nukleotiden durch eine repetitive Sequenz aus 9 Nukleotiden ersetzt. Zwar bleibt trotz des Sequenzaustausches die ursprüngliche 5'-Spleißstelle des Introns erhalten, hat er jedoch ein gestörtes Spleißen des Intron 3 zur Folge. Letztendlich führt der Sequenzaustausch dazu,

dass eine alternative 5'-Spleißstelle, 158 Nukleotide stromabwärts der ursprünglichen, erkannt wird. Als Konsequenz verbleiben große Teile des Introns im reifen Transkript. Die reduzierten Transkriptspiegel in der Mutante *hcf107-2* sind vermutlich auf den gezielten Abbau des Transkriptes, aufgrund eines durch die Mutation verursachten fehlerhaften Stopcodons, zurückzuführen. Der gezielte Abbau von Transkripten mit fehlerhaften Stopcodons ist ein unter Eukaryoten weit verbreitetes Phänomen. Er wird als "Nonsense Mediated Decay" (NMD) bezeichnet und schützt die Zelle vor der Anhäufung fehlerhaft verkürzter Polypeptide (Gutiérrez *et al.* 1999; Culbertson and Leeds 2003).

Aufgrund der Kartierungsergebnisse (Sane *et al.*, Manuskript in Vorbereitung) wurde vermutet, dass die Mutation im *HCF107*-Gen den mutanten Phänotyp verursachte. Um diese Vermutung zu beweisen wurden Komplementationsversuche mit der isolierten *HCF107*-cDNA durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass sich die Mutante *hcf107-2* durch das Agrobakterien-vermittelte Einschleusen eines Konstruktes aus *Hcf107*-cDNA unter Kontrolle des CaMV35S-Promotors vollständig komplementieren ließ. So waren alle untersuchten Komplementanten im Gegensatz zur ursprünglichen Mutante auf Erde lebensfähig und zeigten in Fluoreszenzmessungen den für Wildtyp-Pflanzen typischen Kurvenverlauf. Auf molekularer Ebene bestätigte sich dieses Bild. So akkumulierten die in der Mutante fehlenden 5'-prozessierten *psbH*-Transkripte in den Komplementanten wieder im vollen Umfang. Des Weiteren war in der durchgeführten Immunoblot-Analyse neben *PsbH* auch *PsbB* (CP47) wieder in zum Wildtyp vergleichbaren Mengen detektierbar. Dies verdeutlicht das neben den Defekt auf Prozessierungsebene auch der Defekt bezüglich der *psbB*-Translation durch Einschleusen der *Hcf107*-cDNA vollständig behoben wurde. Demnach ist der Phänotyp der Mutanten *hcf107-1* und *hcf107-2* alleine auf die jeweilige Mutation im isolierten Gen *Hcf107* zurückzuführen. Weiterhin ist für die erfolgreiche Komplementation der Mutante der endogene Promotor des Gens nicht erforderlich, da das Transgen unter Kontrolle des CaMV35S-Promotors transkribiert wurde und sich die im Vergleich zum Wildtyp deutlich erhöhten *HCF107*-Transkriptspiegel nicht negativ auf die Komplementation der Mutante auswirken. Demzufolge ergeben sich zwei Interpretationsmöglichkeiten: 1. Die Expression des Gens *HCF107* wird an einer anderen Stelle als der Transkription reguliert, z.B. der Translation, der Proteinreifung oder beim Import des Proteins in den Chloroplasten. 2. Die Aktivität oder Funktion von HCF107 hängt noch von weiteren Komponenten ab. Somit wäre HCF107 ein für die 5'-Prozessierung von *psbH* und der Translation von *psbB* essentieller Biogenefaktor, jedoch ohne direkte regulatorische Funktion.

3. Funktionelle Analyse des nukleär kodierten Biogenesefaktors HCF107 aus *Arabidopsis thaliana*

3.1 Herstellung Epitop-markierter Komplementationslinien

In dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche C-terminale Fusionkonstrukte erfolgreich zur Komplementation der Mutante *hcf107-2* eingesetzt. Zum einen das Fusionskonstrukt aus *Hcf107*-cDNA und einer 148 Aminosäure großen Protein A-Kassette (pPEX-107PA), bestehend aus zwei IgG-Bindedomänen und einer N-terminalen TEV-Proteaseschnittstelle. Zum anderen ein Konstrukt aus *Hcf107*-cDNA und einem 9 Aminosäure kurzem Hämagglutinin-Epitop (pPEX-107HA). Dies lässt den Schluss zu, dass die über den vorgeschalteten CaMV35S-Promotor transkribierten Fusionskonstrukte funktionale Proteine kodieren, die das Fehlen des endogenen Proteins vollständig kompensieren können. Somit sind die anhand der Fusionsproteine gewonnenen Daten direkt auf die Funktion des wildtypischen HCF107-Proteins übertragbar.

Für die durchzuführenden affinitätschromatographischen Experimente war es aufgrund möglicher falsch-positiver Ergebnisse erforderlich geeignete Kontrollen einzusetzen. Aus diesem Grunde sollten weitere *hcf*-Mutanten mit entsprechenden cDNA-Fusionskonstrukten komplementiert werden. Hierfür wurden zunächst die Mutante *hcf152* aus *A. thaliana* ausgewählt (Meierhoff *et al.* 2003). Die Mutante *hcf152* zeigt wie die Mutante *hcf107* in der Northernanalyse eine Störung im Transkriptionsmuster des plastidären *psbB*-Operon. Im Gegensatz zur Mutante *hcf107* ist jedoch keine PSII- sondern ein Untereinheit des Cytochrom b_6f -Komplexes betroffen. Im Detail zeigt die Mutante einen Defekt in der Prozessierung oder Stabilisierung spezifischer *petB*-Transkripte (Cyt b_6). Das Gen *HCF152* kodiert für ein 87 kDa großes PPR-Protein mit plastidärer Transitsequenz, über die es in das Stroma des Chloroplasten importiert wird. Aufgrund der strukturellen und funktionellen Ähnlichkeiten zu HCF107 wäre diese Mutante somit die ideale Kontrolle für die anstehenden affinitätschromatographischen Experimente gewesen. Sie konnte jedoch nicht mit dem *HCF152*-cDNA-Protein A-Fusionskonstrukt komplementiert werden. Offensichtlich war das durch das eingeschleuste Transgen kodierte HCF152-Protein A-Fusionsprotein in den transgenen Pflanzen nicht funktional. Ursache hierfür ist wahrscheinlich das C-terminale Protein A-Epitop, da sowohl mit einem *Hcf152*-cDNA Konstrukt (Meierhoff *et al.* 2003) als auch mit dem *HCF152*-cDNA-HA-Fusionskonstrukt (diese Arbeit) die Mutante *hcf152* erfolgreich komplementiert werden konnte. Als Konsequenz musste in den entsprechenden Experimenten die in dieser Arbeit erfolgreich mit dem Protein A-Konstrukt komplementierte pleiotrope Mutante *hcf155* (Kroll *et al.* 2001) als Kontrolle eingesetzt werden.

3.2 HCF107 ist im Chloroplasten mit Membranen assoziiert

Zur Klärung der Frage, ob und wo HCF107 im Chloroplasten lokalisiert ist wurden Lokalisationsstudien mit den Epitop-markierten Komplementantenlinien, *HCF107cPA* und *HCF107cHA*, durchgeführt. In beiden Fällen konnte gezeigt werden, dass die Fusionsproteine in den Chloroplasten importiert werden und dort assoziiert mit der jeweiligen Membranfraktion vorliegen (Abb. 13). Die Membranassoziation der beiden Fusionsproteine ließ sich durch Waschung der Chloroplastenmembranen mit Natriumbicarbonat weitgehend aufheben (Abb.13). Diese Tatsache und das Fehlen einer Lokalisationssequenz für die Thylakoidmembran lässt die Schlussfolgerung zu, dass HCF107 als peripher mit der stromalen Seite der Thylakoidmembran assoziiertes Protein im Chloroplasten vorliegt und so mit denen im Stroma transkribierten RNAs in Wechselwirkung treten kann. Wie HCF107 mit der Membran assoziiert ist, ob direkt oder indirekt über weitere Proteine lässt sich anhand der Ergebnisse nicht sagen. Jedoch spricht die Tatsache, dass es sich bei HCF107 um ein weitgehend hydrophiles Protein handelt, für die Beteiligung weiterer Faktoren.

Die Membranassoziation von RNA-bindenden Proteinen wurde bereits in verschiedenen Organellen beobachtet und ist vermutlich für die schnelle Integration der synthetisierten Polypeptide in die Zielmembran erforderlich. So konnte für die mitochondrialen Gene *COX2* und *COX3* aus *Saccharomyces cerevisiae* gezeigt werden, dass für die Assemblierung der translatierten Polypeptide Cox2p und Cox3p in den membranlokalisierte Cytochrom c-Oxidase-Komplex die 5'-untranslatierte Region der Transkripte erforderlich ist (Sanchirico *et al.* 1998). Daneben ist auch einer der drei für die Translation von *COX3* notwendigen Aktivatoren peripher mit der inneren Mitochondrienmembran assoziiert (Fox 1996). Auch in Chloroplasten existieren zahlreiche RNA-bindende Proteine, die mit Membranen assoziiert vorliegen. So wurden in *C. reinhardtii* Proteine nachgewiesen, die lichtreguliert an die 5'-untranslatierte Region der *psbC* (CP43)-mRNA binden und im Chloroplasten assoziiert mit so genannten LD (Low Density)-Membranen vorliegen. Darunter auch RB47 ein spezifischer lichtregulierter Aktivator der *psbA*-Translation (Zerges and Rochaix 1998; Zerges *et al.* 2002). LD-Membranen entsprechen in ihrer Dichte und Lipidzusammensetzung der inneren Hüllmembran, liegen aber assoziiert mit der Thylakoidmembran vor und werden neben dieser als möglicher Syntheseort von Proteinen der Thylakoidmembran diskutiert (Zerges 2000). Da bei den hier durchgeführten Lokalisationsstudien keine weitere Auftrennung der Chloroplastenmembranen erfolgte, besteht zumindest theoretisch die Möglichkeit, dass auch HCF107 assoziiert mit LD-Membranen vorliegt und nicht direkt mit der Thylakoidmembran assoziiert ist.

Ein weiterer wichtiger Aspekt der Ergebnisse der Lokalisationsstudien ist die Tatsache, dass im Falle des HCF107-Protein A-Fusionsprotein auch geringe Mengen des Proteins in der Stromafraktion detektiert werden konnten (Abb. 14). Denn im Gegensatz zu HCF107 liegt

das zu HCF107 orthologe Protein aus *C. reinhardtii* MBB1 als Stromaprotein im Chloroplasten vor (Vaistij *et al.* 2000b). Dieser Unterschied lässt sich dadurch erklären, dass beide Proteine möglicherweise an zum Teil unterschiedlichen Prozessen beteiligt sind. In beiden Mutanten *mbb1* und *hcf107* findet keine Translation der *psbB*-Transkripte statt, jedoch unterscheiden sich die Ursachen. So fehlen in der Mutante *mbb1* die durch 5'-Prozessierung erzeugten translationskompetenten *psbB*-Transkripte während diese in der Mutante *hcf107* vollständig prozessiert werden. Legt man basierend auf diesen Indizien zu Grunde, dass HCF107 im Gegensatz zu MBB1 direkt an der Translation der *psbB*-mRNA beteiligt ist, so ergibt daraus eine mögliche Erklärung für die Assoziation von HCF107 mit der Thylakoidmembran, die einen raschen Einbau des synthetisierten PsbB-Polypeptids an seinem Zielort ermöglichen würde. Tatsache ist jedoch, dass die große Mehrheit der an der 5'-Prozessierung/Stabilisierung und Translation plastidärer Transkripte beteiligten Faktoren wie NAC2, MBB1, CRP1, CRS1 CRS2 und TBC2 im Stroma der Chloroplasten lokalisiert sind (Fisk *et al.* 1999; Boudreau *et al.* 2000; Vaistij *et al.* 2000b; Jenkins and Barkan 2001; Till *et al.* 2001; Auchincloss *et al.* 2002).

3.3 Das TPR-Protein HCF107 ist Bestandteil eines höhermolekularen Komplexes

Verschiedene Indizien deuten darauf hin, dass HCF107 Bestandteil eines Protein- bzw. Protein/RNA-Komplexes ist. Zum einen gehört HCF107 zur Familie der TPR-Proteine, deren Mitglieder in der Regel über ihre TPR-Domänen in Wechselwirkung mit anderen Proteinen treten (Blatch and Lässle 1999). Zum anderen sind MBB1, das zu HCF107 orthologe Protein aus *C. reinhardtii*, sowie die TPR/PPR-Proteine NAC2 (*C. reinhardtii*) und CRP1 (*Z. mays*) allesamt Bestandteile höhermolekularer Komplexe.

Zur Klärung dieser Fragestellung wurden zwei verschiedene Versuchansätze gewählt. Zunächst wurde versucht mittels nativer Gelelektrophorese (BN-PAGE) und anschließender Immunoblot-Analyse den Nachweis eines HCF107-Proteinkomplexes zu erbringen. Weder ein Komplex noch das monomere HCF107-Protein A-Fusionsprotein von 83 kDa Größe konnten, nach der Auftrennung solubilisierter Chloroplasten aus *Hcf107cPA*-Komplementanten mittels nativer Gelelektrophorese (BN-PAGE) in der anschließenden Immunoblot-Analyse detektiert werden (Abb. 15 A und B). Die genaue Ursache für diesen Fehlschlag bleibt unklar. Ein Fehler in der Solubilisierung des Proteins wurde durch entsprechende Kontrollen ausgeschlossen. So konnte nach Auftrennung der Solubilisierungsüberstände mittels denaturierender SDS-PAGE das monomere HCF107-Protein A-Fusionsprotein problemlos in der anschließenden Immunoblotanalyse detektiert werden (ohne Abb.). Weiterhin konnte bei der als Kontrolle eingesetzten Protein A-

etikettierten Komplementante *HCF153cPA* (Sabine Bossmann) das etwa 30 kDa große monomere HCF153-PA Fusionsprotein in der Immunoblot-Analyse unter unterschiedlichsten Bedingungen detektiert werden (Abb. 15 A). Eine mögliche Erklärung ist, dass der Transfer des solubilisierten HCF107-Protein A-Fusionsproteins unter den gewählten Versuchsbedingungen nur unvollständig verläuft, ein Phänomen, das jedoch vor allem beim Elektrotransfer hydrophober Membranproteine auftritt (Small *et al.* 1988).

Beim alternativen Versuchansatz, der nativen Auftrennung der solubilisierten Proteine mittels Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation, konnten hingegen erfolgreich signifikante Mengen des solubilisierten HCF107-Protein A-Fusionsproteins bis in den höhermolekularen Bereich des Gradienten nachgewiesen werden (Abb. 16). Das HCF107-PA-Fusionsprotein konnte dabei bis in Fraktion 11 detektiert werden, was einem Molekulargewicht von etwa 600-800 kDa entspricht. In diesem Größenbereich waren auch vollständig assemblierte Formen des Photosystems I (Fraktion 9 und 10) und des Photosystems II (Fraktion 10 und 11) vorzufinden. Somit konnte in dieser Arbeit zum ersten Mal der Nachweis erbracht werden, dass HCF107 wie MBB1 dem orthologen Protein aus *Chlamydomonas* (Vaistij *et al.* 2000b) und den ebenfalls an der 5'-Prozessierung/Stabilisierung und Translation plastidärer Transkripte beteiligten TPR- bzw. PPR-Proteinen NAC2 (Boudreau *et al.* 2000) und CRP1 (Fisk *et al.* 1999) Bestandteil eines höhermolekularen Komplexes ist.

Insgesamt zeigte das HCF107-PA-Fusionsprotein jedoch eine sehr breite Verteilung über den gesamten Gradienten. Dabei zeigte nur ein relativ geringer Teil des HCF107-Fusionsproteins eine Verschiebung in die höhermolekularen Fraktionen. Der Großteil des Proteins lag nach der Zentrifugation in den Fraktionen 4 bis 7 des Gradienten vor, was einem Molekulargewicht von etwa 100-240 kDa entspricht. Hierfür gibt es mehrere Erklärungsmöglichkeiten. Zunächst besteht die Möglichkeit, dass unter den gewählten Versuchsbedingungen ein Großteil der in den Chloroplasten mit HCF107 assoziierten Proteine aufgrund von zu schwachen oder transienten Wechselwirkungen bereits bei der Solubilisierung vom Komplex abgelöst wurden. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass im Chloroplast zu einem bestimmten Zeitpunkt nur ein relativ geringer Teil des Proteins in der vermutlich aktiven, höhermolekularen Form des Komplexes vorliegt. Der Rest des HCF107 Protein verbleibt als niedermolekulare Komplexform oder als Monomer (83 kDa) in Reserve. Dies würde bedeuten, dass möglicherweise zu einem anderen Zeitpunkt der Chloroplastenbiogenese, z.B. bei der lichtabhängigen Entwicklung von der Proplastide zum ausdifferenzierten Chloroplast, HCF107 aufgrund eines erhöhten Bedarfes der Photosystem II Untereinheiten PsbB und PsbH zu einem größeren Teil oder sogar vollständig in der höhermolekulare Form des Komplexes vorliegt. Zuletzt besteht die Möglichkeit, dass sich HCF107-PA aufgrund des zur Expression verwendeten 35S-Promotors in unnatürlich hohen

Mengen in der Plastide anhäuft, aber wegen der Limitierung weiterer Komponenten nicht zu einem höhermolekularen Komplex assembliert werden kann.

3.4 Affinitätschromatographische Versuche zur Identifizierung möglicher HCF107-Interaktoren

Da HCF107 im Chloroplasten als Bestandteil eines höhermolekularen Komplexes nachgewiesen werden konnte, wurden zur Identifizierung möglicher Interaktoren von HCF107 Affinitätschromatographische Versuche durchgeführt. Dabei zeigte sich zunächst, dass eine Aufreinigung des HCF107-PA-Fusionsproteines prinzipiell möglich ist. So konnte das HCF107-PA-Fusionsprotein im Anschluss an analytische Aufreinigungsversuche eindeutig in den entsprechenden Eluaten mittels Immunoblot-Analysen nachgewiesen werden (Abb. 17). Jedoch zeigten sich bereits hier Probleme mit der zur Aufreinigung der Protein A-Fusionsproteine eingesetzten IgG-Sepharose-Matrix. Diese war instabil, so dass sich unter den verwendeten Elutionsbedingungen große Teil der an die Matrix gekoppelten Immunglobuline von der Matrix ablösten und sich in den Eluaten wieder fanden (Abb. 17 und 18). So ließen sich auch bei der Analyse der Eluate aus präparativen Versuchen lediglich die abgelösten Immunglobuline eindeutig im Coomassie-gefärbten Gel identifizieren (Abb. 18). Ein Nachweis bzw. die Identifizierung des HCF107-Protein A-Fusionsproteins war hingegen nicht möglich. Lediglich bei der als Kontrolle eingesetzten Protein A-etikettierten Komplementante *HCF153cPA* (Sabine Bossmann, Düsseldorf) konnte vermutlich das monomere HCF153-Protein A-Fusionsprotein nachgewiesen werden (Abb. 18).

Demzufolge war unter den verwendeten Versuchsbedingungen bzw. mit der eingesetzten IgG-Sepharose keine effiziente Aufreinigung des HCF107-Protein A-Fusionsproteins möglich. Ursache hierfür war zum einen die instabile Sepharose-Matrix und der daraus resultierende starke Hintergrund bei der Aufreinigung. Zum anderen ist möglicherweise der Protein A-Teil des Fusionsproteins als Bestandteil eines HCF107-Komplexes für eine Aufreinigung mittels IgG-Sepharose nur im beschränkten Maße zugänglich.

Ähnlich große Probleme mit der verwendeten IgG-Sepharose-Matrix zeigten sich beim Versuch in den gewonnenen Eluaten ko-immunopräzipitierte Transkripte mittels Reverser Transkriptase-PCR nachzuweisen. Dabei stellte sich heraus, dass alle untersuchten Eluate unspezifisch mit plastidärer DNA und plastidären Transkripten kontaminiert waren. So konnten zumindest Spuren der Transkripte *psbH*, *psbE*, *petB* und *petD* mittels RT-PCR in allen Eluaten nachgewiesen werden. Daneben zeigte sich jedoch eine Anreicherung der *psbH*-RNA in den Eluaten der Komplementante *Hcf107cPA* (Abb. 19). Dies bedeutet, dass möglicherweise HCF107 im Chloroplast als Komplex assoziiert mit *psbH*-Transkripten

vorliegt und so seine Aufgaben in der 5'-Prozessierung und Stabilisierung dieser Transkripte erfüllt. Ließen sich diese Ergebnisse durch weitere Versuche verifizieren, so wäre HCF107, einer der ersten an der 5'-Prozessierung/Stabilisierung und Translation plastidärer Transkripte beteiligten nukleären Faktoren, für den eine direkte Wechselwirkung mit der entsprechenden Ziel-RNA nachgewiesen werden konnte. Zwar sind auch MBB1 und NAC2 erwiesenermaßen Bestandteile höhermolekularer Komplexe, die im Chloroplast assoziiert mit RNA bzw. Polysomen vorliegen, jedoch konnte bisher keine direkte Wechselwirkung dieser Komplexe mit der entsprechenden Ziel-RNA nachgewiesen werden (Boudreau *et al.* 2000; Vaistij *et al.* 2000b).

4. Die Funktion des nukleär kodierten Faktors HCF107 in der post-transkriptionellen Regulation der plastidären Genexpression

Betrachtet man die Ergebnisse dieser Arbeit im Zusammenhang mit den bereits bekannten Untersuchungen zur Charakterisierung der Mutante *hcf107* (Felder *et al.* 2001) so ergibt sich folgendes Bild.

Die Mutante *hcf107* zeigt auf RNA-Ebene eine Störung in der Prozessierung und Translation des plastidären *psbB*-Operons. So fehlen in der Mutante alle 5'-prozessierten *psbH*-Transkripte (Abb.1) Diese ist Voraussetzung für die Translation der *psbH*-RNA, weshalb in der Mutante keine PsbH-Synthese erfolgt. Zusätzlich und vermutlich unabhängig davon ist die Mutante in der PsbB-Synthese gestört. Für das Fehlen der 5'-prozessierten *psbH*-Transkripte gibt es mehrere denkbare Erklärungen. Zum einen besteht die Möglichkeit, dass der Faktor HCF107 direkt für die endonukleolytische Spaltung zwischen *psbT* und *psbH*, 45 Nukleotide stromaufwärts des *psbH*-Startcodons, zuständig bzw. essentiell ist. Indiz hierfür ist eine leichte Erhöhung der 5'-unprozessierten di- und tricistronischen *psbH*-Transkripte. Dagegen spricht jedoch die Tatsache, dass die durch den gleichen Prozessierungsschritt gebildeten *psbB-psbT*-Transkripte im normalen Umfang akkumulieren (Abb. 1). Demzufolge ist die Funktion von HCF107 eher in der Stabilisierung und Translation als in der Erzeugung 5'-prozessierter *psbH*-Transkripte zu suchen. Ein weiterer Hinweis dafür ist die Beobachtung, dass sich die in den Mutanten *mbb1* und *nac2-26* aus *C. reinhardtii* fehlenden 5'-prozessierten *psbB*- bzw. *psbD*-Transkripte durch Einfügen eines PolyG-Restes in die 5'-untranslatierte Region der Transkripte im entsprechenden Mutanten-Hintergrund stabilisiert werden können. Trotz dieser Stabilisierung werden die Transkripte jedoch nicht translatiert (Nickelsen *et al.* 1999; Vaistij *et al.* 2000a). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Hemmung der Translation durch die Antibiotika Lincomycin und Chloramphenicol in der Mutante *hcf109* aus *A. thaliana* zur Akkumulation der normalerweise fehlenden bzw. in ihren Transkriptspiegeln stark reduzierten *psbB*-Transkripten führt (Meurer *et al.* 2002). Diese

Ergebnisse lassen vermuten, dass ein direkter Zusammenhang zwischen der fehlenden Translation und der Degradation von Transkripten besteht und deutet darauf hin, dass die Funktion von HCF107 bezüglich der 5'-prozessierten *psbH*-Transkripte nicht oder nicht ausschließlich in der Stabilisierung sondern auch in der Translation dieser Transkripte besteht.

Im Falle von PsbB (CP47) ergibt sich ein anderes Bild. Im Gegensatz zu Mbb1, dem zu HCF107 orthologen Protein aus *C. reinhardtii*, welche für die 5'-Prozessierung und Stabilisierung der *psbB*-RNA in *Chlamydomonas* essentiell ist, hat HCF107 in *Arabidopsis* keine erkennbare Funktion in der 5'-Prozessierung oder Stabilisierung der *psbB*-RNA. So akkumulieren die 5'-prozessierten *psbB*-Transkripte in der Mutante *hcf107* auf Wildtypniveau. Dennoch findet unter normalen Bedingungen keine Translation der *psbB*-RNA statt (Felder *et al.* 2001). Demnach beschränkt sich Funktion von HCF107 bezüglich PsbB auf die Translation der 5'-prozessierten *psbB*-Transkripte. Ob diese beiden Funktionen, die Stabilisierung und Translation von *psbH* und die Translation von *psbB*, tatsächlich vollkommen unabhängig voneinander ablaufen, ist bisher nicht geklärt. Bekannt ist jedoch, dass die Translation von *psbB* keine Voraussetzung für die Prozessierung, Stabilisierung oder Translation der *psbH*-RNAs ist. Dies zeigt sich anhand von Untersuchungen zur Mutante *hcf109* (Meurer *et al.* 1996b). So findet in dieser Mutante keine *psbB*-Translation statt, dennoch akkumulieren die 5'-prozessierten *psbH*-Transkripte auf Wildtypniveau und werden translatiert. Deshalb ist es wahrscheinlich, dass das in den Chloroplasten als höhermolekularer Proteinkomplex vorliegende Protein HCF107 wie MBB1 und CRP1 diese beiden Funktionen unabhängig voneinander ausübt. Die Feststellung, dass HCF107 Bestandteil eines Proteinkomplexes ist würde auch erklären, warum in der EMS-Mutante *hcf107-1* der Austausch einer einzelnen Aminosäure an Position 8 (Alanin gegen Threonin) im dritten TPR-Motif des Proteins zu so einem komplexen Phänotyp führt. Offensichtlich ist diese hochkonservierte Aminosäureposition essentiell für die Funktion der TPR-Domäne und damit auch für die Stabilisierung des HCF107-Proteinkomplexes. Dies wird durch die Beobachtung untermauert, dass die Mutation an dieser Position der TPR-Motive 5 oder 7 des Hefeproteins CDC23 zu einem Block der Mitose von Hefezellen beim Übergang von der Metaphase zu Anaphase (Sikorski *et al.* 1993) führt. Erwähnt werden muss hier jedoch auch die Beobachtung, dass die Translation von *psbB* unter bestimmten Bedingungen nicht vollständig blockiert ist. Dies zeigt sich anhand der Tatsache, dass in der Mutante *hcf107* unter Schwachlichtbedingungen PsbB auf bis zu 10 % des Wildtypniveaus akkumuliert (Plücken *et al.* 2002). Weitere Untersuchungen müssen klären, welche Bedeutung dies für die Funktion von HCF107 bezüglich der PsbB-Synthese hat.

V. Zusammenfassung.

Die plastidäre Genexpression wird zu einem großen Teil durch posttranskriptionelle Prozesse reguliert. Zu diesen Prozessen zählen die Prozessierung der 5'- und 3'-untranslatierten Region (UTR) der mRNAs durch Exo- und Endonukleasen, die mRNA-Stabilisierung durch 5'- und 3'-UTR bindende Faktoren sowie die Translation der reifen Transkripte. An diesen Prozessen ist eine Vielzahl nukleär kodierter Faktoren beteiligt. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde einer dieser nukleär kodierten Faktoren anhand der *hcf*- (high chlorophyll fluorescence)-Mutante *hcf107* aus *Arabidopsis thaliana* (Meurer *et al.* 1996; Felder *et al.* 2001) weitergehend charakterisiert. Die Mutante *hcf107* ist, wie aus den vorhergegangenen Untersuchungen bereits bekannt war, spezifisch in der 5'-Prozessierung und/oder Stabilisierung der *psbH*-Transkripte des plastidären *psbB*-Operon betroffen. Des Weiteren findet keine *PsbB*-Synthese statt, ohne dass ein ersichtlicher Defekt auf RNA-Ebene vorliegt (Felder *et al.* 2001).

Das in der Mutante *hcf107* betroffene Gen wurde zuvor bereits mittels markergestützter Kartierung identifiziert und kodiert ein TPR-(tetratricopeptide repeat)-Protein von 652 Aminosäuren Größe (Sane *et al.* 2004). Zur Überprüfung dieser Kartierungsergebnisse wurde die korrespondierende cDNA isoliert und ihre Identität mittels Northern-Analysen und durch die Komplementation homozygoter Mutanten erfolgreich bestätigt. Im Anschluss wurde die klonierte *HCF107*-cDNA zur Herstellung von Protein A- und Hämagglutinininfusionskonstrukten verwendet und diese wiederum erfolgreich zur Komplementation homozygoter Mutanten eingesetzt.

Unter Verwendung dieser Komplementanten (*HCF107cPA*, *HCF107cHA*) wurde der Faktor HCF107 weitergehend molekularbiologisch und biochemisch untersucht. Dabei konnten in Lokalisationsstudien gezeigt werden, dass die HCF107-Fusionsproteine in den Chloroplasten importiert werden und dort assoziiert mit der Thylakoid- und/oder der Chloroplastenmembran vorliegen.

Bei der Auftrennung solubilisierter Chloroplasten aus *HCF107cPA*-Pflanzen im linearen Saccharosedichtegradienten zeigte ein Teil des HCF107-Protein A-Fusionsproteins eine Verschiebung in den höhermolekularen Bereich des Gradienten mit einer Größe von bis zu 800 kDa. Somit konnte zum ersten Mal der Nachweis erbracht werden, dass HCF107 Bestandteil eines höhermolekularen Komplexes ist.

Zur Identifizierung möglicher Interaktionspartner bzw. Komplexkomponenten wurden IgG-Affinitätschromatographie-Versuche mit solubilisierten Chloroplasten aus *HCF107cPA*-Pflanzen durchgeführt. Dabei konnte das HCF107-Protein A-Fusionsprotein in analytischen Mengen aufgereinigt werden, ein Nachweis möglicher interagierender Proteinkomponenten blieb jedoch erfolglos.

Dagegen konnte in den Eluaten von *HCF107cPA*-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte Anreicherung von *psbH*-Transkripten mittels Reverse Transkriptase-PCR nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass *psbH*-RNAs Bestandteil des HCF107-Komplexes sind bzw. mit ihm assoziiert vorliegen.

VI. Anhang

Leseraster des Gens *HCF107* aus *Arabidopsis thaliana*:

```

M H F F F V P N S S S S S P S P A N T S
ATG CAC TTC TTC TTC GTG CCG AAT TCT TCG TCT TCA TCT CCT TCT TCA CCG GCC AAT ACT TCT
          9          18          27          36          45          54

S F S L S F L T P Q I P E N L C K S P T K I
TCA TTC TCG CTA TCG TTT CTC ACT CCT CAA ATT CCT GAG AAT CTC TGT AAG TCA CCG ACG AAA ATC
          69          78          87          96          105          114          123

H I G T H G I S G Q S F L S H P T F S S K N
CAC ATC GGA ACT CAT GGA ATC TCC GGT CAA TCG TTT CTC AGT CAT CCT ACT TTC TCA TCT AAG AAC
          135          144          153          162          171          180          189

T Y L Y A V V D R S S S G V F S P Q K E S A
ACG TAT CTG TAT GCA GTC GTC GAC AGG TCT TCT TCA GGT GTA TTT TCG CCG CAA AAG GAA TCT GCC
          201          210          219          228          237          246          255

N G E G E E S N T E E G V L V V R R P L L E
AAT GGC GAG GGA GAG GAA TCT AAC ACG GAG GAG GGA GTA TTA GTA GTT CGA CCG CCG TTG TTG GAG
          267          276          285          294          303          312          321

N S D K E S S E E E G K K Y P A R I D A G L
AAT TCC GAT AAG GAA TCT AGT GAG GAA GAG GGA AAA AAG TAT CCA GCG AGG ATC GAT GCT GGT CTG
          333          342          351          360          369          378          387

S N I A K K M P I F E P E R S E S S S S S
AGT AAT ATA GCT AAG AAG ATG CCG ATA TTT GAG CCG GAG AGA TCG GAA TCG TCG TCG TCA TCT TCA
          399          408          417          426          435          444          453

A A A A A R A Q E R P L A V N L D L S L Y K
GCC GCT GCT GCT GCA AGA GCT CAA GAG AGA CCG CTT GCG GTG AAT TTG GAC TTG TCT CTG TAC AAA
          465          474          483          492          501          510          519

A K V L A R N F R Y K D A E K I L E K C I A
GCA AAG GTT TTG GCG AGA AAT TTC AGA TAC AAA GAC GCC GAG AAG ATT CTA GAG AAG TGC ATA GCT
          531          540          549          558          567          576          585

Y W P E D G R P Y V A L G K I L S K Q S K L
TAC TGG CCG GAG GAT GGG AGA CCG TAC GTG GCA TTG GGG AAG ATA CTA AGC AAA CAA TCC AAG TTA
          597          606          615          624          633          642          651

A E A R I L Y E K G C Q S T Q G E N S Y I W
GCT GAA GCT CGA ATC CTG TAT GAA AAA GGG TGT CAA TCT ACA CAA GGA GAG AAT TCA TAC ATT TGG
          663          672          681          690          699          708          717

Q C W A V L E N R L G N V R R A R E L F D A
CAG TGT TGG GCT GTC CTG GAA AAC AGG TTG GGA AAT GTA AGA AGA GCC AGG GAG TTG TTT GAT GCA
          729          738          747          756          765          774          783

A T V A D K K H V A A W H G W A N L E I K Q
GCC ACG GTG GCT GAC AAG AAG CAT GTA GCA GCC TGG CAT GGA TGG GCA AAC CTG GAG ATA AAA CAA
          795          804          813          822          831          840          849

G N I S K A R N L L A K G L K F C G R N E Y
GGA AAT ATA AGT AAA GCA AGG AAT CTT CTA GCC AAA GGC CTC AAG TTT TGT GGC AGA AAC GAG TAT
          861          870          879          888          897          906          915

I Y Q T L A L L E A K A G R Y E Q A R Y L F
ATC TAC CAA ACA CTT GCC TTG TTG GAG GCC AAA GCT GGC CCG TAT GAA CAG GCA AGG TAC CTG TTC
          927          936          945          954          963          972          981

K Q A T I C N S R S C A S W L A W A Q L E I
AAG CAG GCG ACT ATA TGC AAT TCA AGG AGT TGT GCC AGT TGG TTG GCA TGG GCA CAG TTG GAA ATA
          993          1002          1011          1020          1029          1038          1047

Q Q E R Y P A A R K L F E K A V Q A S P K N
CAG CAG GAA AGA TAC CCA GCT GCT AGA AAG CTT TTT GAG AAA GCT GTC CAG GCA AGC CCC AAG AAT
          1059          1068          1077          1086          1095          1104          1113

```

R F A W H V W G V F E A G V G N V E R G R K
 AGA TTT GCG TGG CAC GTA TGG GGG GTG TTT GAA GCT GGA GTA GGT AAT GTT GAG CGT GGA AGA AAG
 1125 1134 1143 1152 1161 1170 1179

L L K I G H A L N P R D P V L L Q S L G L L
 CTC CTG AAG ATA GGT CAT GCG CTA AAT CCT AGA GAC CCT GTT CTC CTT CAG TCC CTT GGC TTA CTG
 1191 1200 1209 1218 1227 1236 1245

E Y K H S S A N L A R A L L R R A S E L D P
 GAG TAC AAA CAT TCA TCT GCT AAT CTT GCC CGG GCT TTA CTA AGG AGA GCA TCA GAG CTC GAT CCT
 1257 1266 1275 1284 1293 1302 1311

R H Q P V W I A W G W M E W K E G N T T T A
 AGA CAT CAA CCT GTT TGG ATT GCT TGG GGT TGG ATG GAA TGG AAA GAA GGA AAC ACA ACA ACA GCT
 1323 1332 1341 1350 1359 1368 1377

R E L Y Q R A L S I D A N T E S A S R C L Q
 AGA GAA CTT TAC CAA AGA GCT CTC TCC ATT GAT GCA AAT ACC GAA AGT GCT TCT CGC TGT CTA CAG
 1389 1398 1407 1416 1425 1434 1443

A W G V L E Q R A G N L S A A R R L F R S S
 GCG TGG GGA GTT CTC GAG CAG AGA GCA GGA AAC TTA TCA GCA GCA AGA AGA TTA TTC AGA TCT TCA
 1455 1464 1473 1482 1491 1500 1509

L N I N S Q S Y V T W M T W A Q L E E D Q G
 TTG AAC ATT AAC TCA CAA AGC TAC GTT ACA TGG ATG ACA TGG GCA CAA CTT GAG GAA GAT CAA GGA
 1521 1530 1539 1548 1557 1566 1575

D T E R A E E I R N L Y F Q Q R T E V V D D
 GAC ACC GAA CGT GCT GAA GAA ATC CGT AAC CTC TAT TTT CAA CAA CGC ACA GAG GTT GTT GAT GAT
 1587 1596 1605 1614 1623 1632 1641

A S W V T G F L D I I D P A L D T V K R L L
 GCT TCG TGG GTC ACA GGA TTC TTG GAT ATT ATT GAC CCG GCT TTA GAC ACC GTT AAA AGG CTC TTG
 1653 1662 1671 1680 1689 1698 1707

N F G Q N N D N N R L T T T L R N M N R T K
 AAC TTT GGT CAG AAC AAT GAC AAC AAC AGA TTA ACT ACT ACT CTT AGA AAC ATG AAT AGA ACC AAA
 1719 1728 1737 1746 1755 1764 1773

D S Q S N Q Q P E S S A G R E D I E T G S G
 GAT AGC CAA TCC AAT CAG CAA CCC GAG AGC TCT GCG GGA CGC GAG GAC ATT GAA ACT GGG AGC GGG
 1785 1794 1803 1812 1821 1830 1839

F N L D V F L R S K L S L D P L K L D V N L
 TTT AAC CTC GAT GTA TTT TTA CGC TCG AAG CTG TCG TTG GAT CCT TTG AAG CTG GAC GTT AAT CTT
 1851 1860 1869 1878 1887 1896 1905

D S K R L E R F T R G R I N G A [AS]
 GAT TCT AAG AGG TTA GAG AGA TTC ACT AGA GGA AGA ATA AAT GGT GCT TGA [bp]
 1917 1926 1935 1944 1953

VII. Literatur

- Allison, L. A., L. D. Simon and P. Maliga (1996). "Deletion of *rpoB* reveals a second distinct transcription system in plastids of higher plants." EMBO J **15**: 2802-2809.
- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers and D. J. Lipman (1990). "Basic local alignment search tool." J Mol Biol **215**: 403-410.
- Auchincloss, A. H., W. Zerges, K. Perron, J. GirardBascou and J. D. Rochaix (2002). "Characterization of Tbc2, a nucleus-encoded factor specifically required for translation of the chloroplast *psbC* mRNA in *Chlamydomonas reinhardtii*." J Cell Biol **157**: 953-962.
- Bairoch, A. and P. Bucher (1994). "PROSITE: Recent developments." Nucl Acid Res **22**: 3583-3589.
- 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. (1998). "Approaches to investigating nuclear genes that function in chloroplast biogenesis in land plants." Meth Enzymol **297**: 38-57.
- Barkan, A. and M. Goldschmidt-Clermont (2000). "Participation of nuclear genes in chloroplast gene expression." Biochimie **82**: 559-572.
- Barkan, A., R. Voelker, J. Mendel-Hartvig, D. Johnson and M. Walker (1995). "Genetic analysis of chloroplast biogenesis in higher plants." Physiol Plant **93**: 163-170.
- Barkan, A., M. Walker, M. Nolasco and D. Johnson (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.
- Baumgartner, B. J., J. C. Rapp and J. E. Mullet (1989). "Plastid transcription activity and DNA copy number increase early in barley chloroplast development." Plant Physiol **89**: 1011-1018.
- Bechtold, N., J. Ellis and G. Pelletier (1993). "*In planta Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants." C R Acad Sci Ser III Vie **316**: 1194-1199.
- Ben-Yehuda, S., I. Dix, C. Russell, M. McGarvey, J. Beggs and M. Kupiec (2000). "Genetic and Physical Interactions Between Factors Involved in Both Cell Cycle Progression and Pre-mRNA Splicing in *Saccharomyces cerevisiae*." Genetics **156**: 1503-1517.
- Birnboim, H. and J. Doly (1979). "A rapid alkaline extraction method for screening recombinant plasmid DNA." Nucl Acid Res **7**: 1513-1524.
- Blatch, G. L. and M. Lässle (1999). "The tetratricopeptide repeat: a structural motif mediating protein-protein interactions." BioEssays **21**: 932-939.
- Bock, R. (2000). "Sense from nonsense: how the genetic information of chloroplasts is altered by RNA editing." Biochimie **82**: 549-557.
- Boudreau, E., J. Nickelsen, S. D. Lemaire, F. Ossenbühl and J. D. Rochaix (2000). "The *Nac2* gene of *Chlamydomonas* encodes a chloroplast TPR-like protein involved in *psbD* mRNA stability." EMBO J **19**: 3366-3376.
- Bradford, M. M. (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.
- Bruick, R. K. and S. P. Mayfield (1999). "Light-activated translation of chloroplast mRNAs." Trends Plant Sci **4**: 190-195.

- Chen, Q., C. Adams, L. Usack, J. Yang, R. Monde and D. Stern (1995). "An AU-rich element in the 3' untranslated region of the spinach chloroplast *petD* gene participates in sequence-specific RNA-protein complex formation." Mol. Cell. Biol. **15**(4): 2010-2018.
- Church, G. M. and W. Gilbert (1984). "Genomic sequencing." Proc Natl Acad Sci USA **81**: 1991-1995.
- Clough, S. J. and A. F. Bent (1998). "Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*." Plant J **16**: 735-743.
- Congdon, R. W., G. W. Muth and A. G. Splittgerber (1993). "The binding interaction of Coomassie blue with proteins." Anal Biochem **213**: 407-413.
- Culbertson, M. R. and P. F. Leeds (2003). "Looking at mRNA decay pathways through the window of molecular evolution." Current Opinion in Genetics & Development.
- Danon, A. and S. P. Y. Mayfield (1991). "Light-regulated translational activators: identification of chloroplast gene specific mRNA binding proteins." EMBO J **10**: 3993-4001.
- Das, A. K., P. T. W. Cohen and D. Barford (1998). "The structure of the tetratricopeptide repeats of protein phosphatase 5: implications for TPR-mediated protein-protein interactions." EMBO J **17**: 1192-1199.
- Deng, X. W. and W. Gruissem (1987). "Control of plastid gene expression during development: the limited role of transcriptional regulation." Cell **49**: 379-387.
- Douglas, S. E. (1994). Chloroplast origins and evolution. The Molecular Biology of Cyanobacteria. D. A. Bryant. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers: 91-118.
- Drager, R. G., J. Girard-Bascou, Y. Choquet, K. L. Kindle and D. B. Stern (1998). "*In vivo* evidence for 5'→3' exoribonuclease degradation of an unstable chloroplast mRNA." Plant J **13**: 85-96.
- Drager, R. G., D. C. Higgs, K. L. Kindle and D. B. Stern (1999). "5' to 3' exoribonucleolytic activity is a normal component of chloroplast mRNA decay pathways." Plant J **19**: 521-531.
- Edwards, K., C. Johnstone and C. Thompson (1991). "A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis." Nucl Acid Res **19**: 1349.
- Erickson, J. M. and J. D. Rochaix (1992). The molecular biology of photosystem II. Topics in Photosynthesis, Vol. 11, The Photosystems: Structure, Function and Molecular Biology. J. Barber. Amsterdam, Elsevier Science Publishers: 101-177.
- Feinberg, A. P. and B. Vogelstein (1983). "A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity." Anal Biochem **132**: 6-13.
- Felder, S., K. Meierhoff, A. P. Sane, J. Meurer, C. Driemel, H. Plücker, P. Klaff, B. Stein, N. Bechtold and P. Westhoff (2001). "The nucleus-encoded *HCF107* gene of *Arabidopsis* provides a link between intergenic RNA processing and the accumulation of translation-competent *psbH* transcripts in chloroplasts." Plant Cell **13**: 2127-2141.
- Fisk, D. G., M. B. Walker and A. Barkan (1999). "Molecular cloning of the maize gene *crp1* reveals similarity between regulators of mitochondrial and chloroplast gene expression." EMBO J **18**: 2621-2630.
- Fox, T. D. (1996). "Genetics of mitochondrial translation. In: Translational Control, vol. ed. J.W.B. Hershey, M.B. Matthews and N. Sonenberg, Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Press." 733-758.
- Fujiki, Y., A. L. Hubbard, S. Fowler and P. B. Lazarow (1982). "Isolation of intracellular membranes by means of sodium carbonate treatment: application to endoplasmic reticulum." J Cell Biol **93**: 97-102.

- Fujiwara, M., A. Nagashima, K. Kanamaru, K. Tanaka and H. Takahashi (2000). "Three new nuclear genes, *sigD*, *sigE* and *sigF*, encoding putative plastid RNA polymerase σ factors in *Arabidopsis thaliana*." FEBS Lett **481**: 47-52.
- Genty, B., J.-M. Briantais and N. R. Baker (1989). "The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence." Biochim Biophys Acta **990**: 87-92.
- Goldschmidt-Clermont, M. (1998). "Coordination of nuclear and chloroplast gene expression in plant cells." Int Rev Cytol **177**: 115-180.
- Gutiérrez, R. A., G. C. MacIntosh and P. J. Green (1999). "Current perspectives on mRNA stability in plants: multiple levels and mechanisms of control." Trends Plant Sci **4**: 429-438.
- Hajdukiewicz, P. T. J., L. A. Allison and P. Maliga (1997). "The two RNA polymerases encoded by the nuclear and plastid compartments transcribe distinct groups of genes in tobacco plastids." EMBO J.
- Hajdukiewicz, P. T. J., L. A. Allison and P. Maliga (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.
- Haley, J. and L. Bogorad (1990). "Alternative promoters are used for genes within maize chloroplast polycistronic transcription units." Plant Cell **2**: 323-333.
- Hanahan, D., J. Jessee and F. R. Bloom (1991). "Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria." Meth Enzymol **204**: 63-113.
- Hanley-Bowdoin, L. and N. H. Chua (1987). "Chloroplast promoters." Trends Biochem Sci **12**: 67-70.
- Hayes, R., J. Kudla and W. Gruissem (1999). "Degrading chloroplast mRNA: the role of polyadenylation." Trends Biochem Sci **24**: 199-202.
- Hayes, R., J. Kudla, G. Schuster, L. Gabay, P. Maliga and W. Gruissem (1996). "Chloroplast mRNA 3'-end processing by a high molecular weight protein complex is regulated by nuclear encoded RNA binding proteins." EMBO J **15**: 1132-1141.
- Herrin, D., Y. Chen and G. Schmidt (1990). "RNA splicing in *Chlamydomonas* chloroplasts. Self-splicing of 23 S preRNA [published erratum appears in J Biol Chem 1991 Feb 25;266(6):4023]." J. Biol. Chem. **265**(34): 21134-21140.
- Herrmann, R. G., P. Westhoff, J. Alt, J. Tittgen and N. Nelson (1985). Thylakoid membrane proteins and their genes. Molecular Form and Function of the Plant Genome. L. van Vloten-Doting, G. S. P. Groot and T. C. Hall. New York, Plenum Publishing Corporation: 233-256.
- Hess, W. R., A. Prombona, B. Fieder, A. R. Subramanian and T. Börner (1993). "Chloroplast *rps15* and the *rpoB/C1/C2* gene cluster are strongly transcribed in ribosome-deficient plastids: Evidence for a functioning non-chloroplast-encoded RNA polymerase." EMBO J **12**: 563-571.
- Hirose, T., T. Kusumegi, T. Tsudzuki and M. Sugiura (1999). "RNA editing sites in tobacco chloroplast transcripts: editing as a possible regulator of chloroplast RNA polymerase activity." Mol Gen Genet **262**: 462-467.
- Hirose, T. and M. Sugiura (1997). "Both RNA editing and RNA cleavage are required for translation of tobacco chloroplast *ndhD* mRNA: a possible regulatory mechanism for the expression of a chloroplast operon consisting of functionally unrelated genes." EMBO J **16**: 6804-6811.
- Hirose, T. and M. Sugiura (2001). "Involvement of a site-specific trans-acting factor and a common RNA-binding protein in the editing of chloroplast mRNAs: development of a chloroplast in vitro RNA editing system." EMBO J. **20**(5): 1144-1152.

- Hofmann, K. (1998). "Protein classification & functional assignment." Trends Biotechnol Suppl.: 18-21.
- Holloway, S. P. and D. L. Herrin (1998). "Processing of a Composite Large Subunit rRNA: Studies with *Chlamydomonas* Mutants Deficient in Maturation of the 23S-like rRNA." Plant Cell **10**(7): 1193-1206.
- Holmes, D. S. and M. Quigley (1981). "A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids." Anal Biochem **114**: 193-197.
- Isono, K., M. Shimizu, K. Yoshimoto, Y. Niwa, K. Satoh, A. Yokota and H. Kobayashi (1997). "Leaf-specifically 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.
- Jenkins, B. D. and A. Barkan (2001). "Recruitment of a peptidyl-tRNA hydrolase as a facilitator of group II intron splicing in chloroplasts." EMBO J **20**: 872-879.
- Jenkins, B. D., D. J. Kulhanek and A. Barkan (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.
- Kapoor, S., J. Y. Suzuki and M. Sugiura (1997). "Identification and functional significance of a new class of non-consensus-type plastid promoters." Plant J **11**: 327-337.
- Karcher, D. and R. Bock (1998). "Site-selective inhibition of plastid RNA editing by heat shock and antibiotics: a role for plastid translation in RNA editing." Nucl Acid Res **26**: 1185-1190.
- Kim, S. J., S. Jansson, N. E. Hoffman, C. Robinson and A. Mant (1999). "Distinct "assisted" and "spontaneous" mechanisms for the insertion of polytopic chlorophyll-binding proteins into the thylakoid membrane." J Biol Chem **274**: 4715-4721.
- Kim, S. J., C. Robinson and A. Mant (1998). "Sec/SRP-independent insertion of two thylakoid membrane proteins bearing cleavable signal peptides." FEBS Lett **424**: 105-108.
- Koncz, C., N. Martini, L. Szabados, M. Hroudá, A. Bachmair and J. Schell (1994). Specialized vectors for gene tagging and expression studies. Plant Molecular Biology Manual, Vol. B2. S. B. Gelvin and R. A. Schilperoort. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers: 1-22.
- Krause, G. H. and E. Weis (1991). "Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The basics." Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol **42**: 313-349.
- Kroll, D., K. Meierhoff, N. Bechtold, M. Kinoshita, S. Westphal, U. C. Voithknecht, J. Soll and P. Westhoff (2001). "*VIPP1*, a nuclear gene of *Arabidopsis thaliana* essential for thylakoid membrane formation." Proc Natl Acad Sci USA **98**: 4238-4242.
- Kudla, J., R. Hayes and W. Gruissem (1996). "Polyadenylation accelerates degradation of chloroplast mRNA." EMBO J **15**: 7137-7146.
- Kudla, J., G. L. Igloi, M. Metzlauff, R. Hagemann and H. Kössel (1992). "RNA editing in tobacco chloroplasts leads to the formation of a translatable *psbL* mRNA by a C to U substitution within the initiation codon." EMBO J **11**: 1099-1103.
- Lamppa, G. K. (1988). "The chlorophyll a/b-binding protein inserts into the thylakoids independent of its cognate transit peptide." J Biol Chem **263**: 14996-14999.
- Lennartz, K., H. Plucken, A. Seidler, P. Westhoff, N. Bechtold and K. Meierhoff (2001). "HCF164 encodes a thioredoxin-like protein involved in the biogenesis of the cytochrome b(6)f complex in *Arabidopsis*." Plant Cell **13**: 2539-2551.

- 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.
- Leto, K. J., E. Bell and L. McIntosh (1985). "Nuclear mutation leads to an accelerated turnover of chloroplast-encoded 48 kd and 34.5 kd polypeptides in thylakoids lacking photosystem II." EMBO J **4**: 1645-1653.
- Levy, H., K. L. Kindle and D. B. Stern (1997). "A nuclear mutation that affects the 3' processing of several mRNAs in *Chlamydomonas* chloroplasts." Plant Cell **9**: 825-836.
- Levy, H., K. L. Kindle and D. B. Stern (1999). "Target and Specificity of a Nuclear Gene Product That Participates in mRNA 3'-End Formation in *Chlamydomonas* Chloroplasts." J. Biol. Chem. **274**(50): 35955-35962.
- Li, F., S. P. Holloway, J. Lee and D. L. Herrin (2002). "Nuclear genes that promote splicing of group I introns in the chloroplast 23S rRNA and *psbA* genes in *Chlamydomonas reinhardtii*." Plant J **32**(4): 467-480.
- Liere, K. and G. Link (1997). "Chloroplast endoribonuclease p54 involved in RNA 3'-end processing is regulated by phosphorylation and redox state." Nucl Acid Res **25**: 2403-2408.
- Liere, K. and P. Maliga (1999). "*In vitro* characterization of the tobacco *rpoB* promoter reveals a core sequence motif conserved between phage-type plastid and plant mitochondrial promoters." EMBO J **18**: 249-257.
- MacKinney, G. (1941). "Absorption of light by chlorophyll solutions." J. Biol. Chem. **140**: 315-322.
- Maier, R. M., B. Hoch, P. Zeltz and H. Kössel (1992). "Internal editing of the maize chloroplast *ndhA* transcript restores codons for conserved amino acids." Plant Cell **4**: 609-616.
- Mant, A., C. A. Woolhead, M. Moore, R. Henry and C. Robinson (2001). "Insertion of PsaK into the thylakoid membrane in a "horseshoe" conformation occurs in the absence of signal recognition particle, nucleoside triphosphates, or functional Albino3." J Biol Chem **276**: 36200-36206.
- Mayfield, S. P., C. B. Yohn, A. Cohen and A. Danon (1995). "Regulation of chloroplast gene expression." Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol **46**: 147-166.
- McMaster, G. K. and G. G. Carmichael (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.
- Meierhoff, K., S. Felder, T. Nakamura, N. Bechtold and G. Schuster (2003). "HCF152 - an Arabidopsis RNA Binding Pentatricopeptide Repeat Protein involved in the Processing of Chloroplast *psbB-psbT-psbH-petB-petD* RNAs." Plant Cell.
- Memon, A. R., B. Y. Meng and J. E. Mullet (1996). "RNA-binding proteins of 37/38 kDa bind specifically to the barley chloroplast *psbA* 3'-end untranslated RNA." Plant Mol Biol **30**: 1195-1205.
- Meurer, J., A. Berger and P. Westhoff (1996b). "A nuclear mutant of Arabidopsis with impaired stability on distinct transcripts of the plastid *psbB*, *psbD/C*, *ndhH*, and *ndhC* operons." Plant Cell **8**: 1193-1207.
- Meurer, J., L. Lezhneva, K. Amann, M. Godel, S. Bezhani, I. Sherameti and R. Oelmüller (2002). "A peptide chain release factor 2 affects the stability of UGA-containing transcripts in Arabidopsis chloroplasts." Plant Cell **14**(12): 3255-3269.

- Meurer, J., K. Meierhoff and P. Westhoff (1996). "Isolation of high-chlorophyll-fluorescence mutants of *Arabidopsis thaliana* and their characterisation by spectroscopy, immunoblotting and Northern hybridisation." Planta **198**: 385-396.
- Meurer, J., K. Meierhoff and P. Westhoff (1996a). "Isolation of high-chlorophyll-fluorescence mutants of *Arabidopsis thaliana* and their characterisation by spectroscopy, immunoblotting and Northern hybridisation." Planta **198**: 385-396.
- Meurer, J., H. Plücker, K. V. Kowallik and P. Westhoff (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. Methods in Chloroplast Molecular Biology. M. Edelman, R. Hallick and N.-H. Chua. Amsterdam, Elsevier Biomedical Press: 75-107.
- Miles, D. (1994). "The role of high chlorophyll fluorescence photosynthesis mutants in the analysis of chloroplast thylakoid membrane assembly and function." Maydica **39**: 35-45.
- Miyamoto, T., J. Obokata and M. Sugiura (2002). "Recognition of RNA Editing Sites Is Directed by Unique Proteins in Chloroplasts: Biochemical Identification of cis-Acting Elements and trans-Acting Factors Involved in RNA Editing in Tobacco and Pea Chloroplasts." Mol. Cell. Biol. **22**(19): 6726-6734.
- Miyamoto, T., J. Obokata and M. Sugiura (2004). "A site-specific factor interacts directly with its cognate RNA editing site in chloroplast transcripts." PNAS **101**(1): 48-52.
- Monde, R. A., G. Schuster and D. B. Stern (2000). "Processing and degradation of chloroplast mRNA." Biochimie **82**: 573-582.
- Murashige, T. and F. Skoog (1962). "A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures." Physiol Plant **15**: 473-497.
- Nickelsen, J., M. Fleischmann, E. Boudreau, M. Rahire and J. D. Rochaix (1999). "Identification of cis-acting RNA leader elements required for chloroplast *psbD* gene expression in *Chlamydomonas*." Plant Cell **11**: 957-970.
- Nickelsen, J. and G. Link (1993). "The 54 kDa RNA-binding protein from mustard chloroplasts mediates endonucleolytic transcript 3' end formation *in vitro*." Plant J **3**: 537-544.
- Nickelsen, J., J. van Dillewijn, M. Rahire and J.-D. Rochaix (1994). "Determinants for stability of the chloroplast *psbD* RNA are located within its short leader region in *Chlamydomonas reinhardtii*." EMBO J **13**: 3182-3191.
- Oikawa, K., K. Tanaka and H. Takahashi (1998). "Two types of differentially photo-regulated nuclear genes that encode σ factors for chloroplast RNA polymerase in the red alga *Cyanidium caldarium* strain RK-1." Gene **210**: 277-285.
- Plücker, H., B. Müller, D. Grohmann, P. Westhoff and L. A. Eichacker (2002). "The HCF136 protein is essential for assembly of the photosystem II reaction center in *Arabidopsis thaliana*." Febs Lett **532**(1-2): 85-90.
- Rapp, J. C., B. J. Baumgartner and J. Mullet (1992). "Quantitative analysis of transcription and RNA levels of 15 barley chloroplast genes. Transcription rates and mRNA levels vary over 300-fold; Predicted mRNA stabilities vary 30-fold." J Biol Chem **267**: 21404-21411.
- Robinson, C. and A. Bolhuis (2001). "Protein targeting by the twin-arginine translocation pathway." Nat Rev Mol Cell Biol **2**: 350-356.
- Robinson, C., C. Woolhead and W. Edwards (2000). "Transport of proteins into and across the thylakoid membrane." J. Exp. Bot. **51**(90001): 369-374.

- Rochaix, J. D. (2002). "Chlamydomonas, a model system for studying the assembly and dynamics of photosynthetic complexes." Febs Lett **529**(1): 34-38.
- Rosche, E. and P. Westhoff (1995). "Genomic structure and expression of the pyruvate, orthophosphate dikinase gene of the dicotyledonous C₄ plant *Flaveria trinervia* (Asteraceae)." Plant Mol Biol **29**: 663-678.
- Rott, R., R. G. Drager, D. B. Stern and G. Schuster (1996). "The 3' untranslated regions of chloroplast genes in *Chlamydomonas reinhardtii* do not serve as efficient transcriptional terminators." Mol Gen Genet **252**: 676-683.
- Rott, R., H. Levy, R. G. Drager, D. B. Stern and G. Schuster (1998). "3'-processed mRNA is preferentially translated in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts." Mol Cell Biol **18**: 4605-4611.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis and H. A. Erlich (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." Science **239**: 487-491.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis (1989). Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanchirico, M. E., T. D. Fox and T. L. Mason (1998). "Accumulation of mitochondrially synthesized *Saccharomyces cerevisiae* Cox2p and Cox3p depends on targeting information in untranslated portions of their mRNAs." EMBO J **17**: 5796-5804.
- Sane, A. P., B. Stein and P. Westhoff (2004). "Manuskript in Vorbereitung."
- Schägger, H., W. A. Cramer and G. von Jagow (1994). "Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis." Anal Biochem **217**: 220-230.
- Schägger, H. and G. von Jagow (1987). "Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa." Anal Biochem **166**: 368-379.
- Schägger, H. and G. von Jagow (1991). "Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form." Anal Biochem **199**: 223-231.
- 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., U. Schliwa and W. Bilger (1986). "Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer." Photosynth Res **10**: 51-62.
- Schuster, G., I. Lisitsky and P. Klaff (1999). "Polyadenylation and degradation of mRNA in the chloroplast." Plant Physiol **120**: 937-944.
- Sikorski, R., W. Michaud and P. Hieter (1993). "p62cdc23 of *Saccharomyces cerevisiae*: A Nuclear Tetratricopeptide Repeat Protein with Two Mutable Domains." Molecular and Cellular Biology **13**: 1212-1221.
- Small, G. M., T. Imkanaka and P. B. Lazarow (1988). "Immunoblotting of Hydrophobic Integral Membrane Proteins." Analytical Biochemistry **169**: 405-409.
- Small, I. D. and N. Peeters (2000). "The PPR motif - a TPR-related motif prevalent in plant organellar proteins." Trends Biochem Sci **25**: 46-47.

- Stern, D. B. and W. Gruissem (1987). "Control of plastid gene expression: 3' inverted repeats act as mRNA processing and stabilizing elements, but do not terminate transcription." Cell **51**: 1145-1157.
- Stern, D. B., H. Jones and W. Gruissem (1989). "Function of plastid mRNA 3' inverted repeats. RNA stabilization and gene-specific protein binding." J Biol Chem **264**: 18742-18750.
- Sugiura, M., T. Hirose and M. Sugita (1998). "Evolution and mechanism of translation in chloroplasts." Annu Rev Genet **32**: 437-459.
- Swiatek, M., R. Kuras, A. Sokolenko, D. Higgs, J. Olive, G. Cinque, B. Müller, L. A. Eichacker, D. B. Stern, R. Bassi, R. G. Herrmann and F. A. Wollman (2001). "The chloroplast gene *ycf9* encodes a photosystem II (PSII) core subunit, PsbZ, that participates in PSII supramolecular architecture." Plant Cell **13**: 1347-1367.
- Tanaka, K., K. Oikawa, N. Ohta, H. Kuroiwa, T. Kuroiwa and H. Takahashi (1996). "Nuclear encoding of a chloroplast RNA polymerase sigma subunit in a red alga." Science **272**: 1932-1935.
- Tanaka, K., Y. Tozawa, N. Mochizuki, K. Shinozaki, A. Nagatani, K. Wakasa and H. Takahashi (1997). "Characterization of three cDNA species encoding plastid RNA polymerase sigma factors in *Arabidopsis thaliana*: Evidence for the sigma factor heterogeneity in higher plant plastids." FEBS Lett **413**: 309-313.
- Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin and D. G. Higgins (1997). "The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools." Nucl Acid Res **25**: 4876-4882.
- Till, B., C. Schmitz-Linneweber, R. Williams-Carrier and A. Barkan (2001). "CRS1 is a novel group II intron splicing factor that was derived from a domain of ancient origin." RNA **7**: 1227-1238.
- Towbin, H., T. Staehelin and J. Gordon (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." Proc Natl Acad Sci USA **76**: 4350-4354.
- Trebitsh, T. and A. Danon (2001). "Translation of chloroplast *psbA* mRNA is regulated by signals initiated by both photosystems II and I." Proc Natl Acad Sci USA **98**: 12289-12294.
- Trebitsh, T., A. Levitan, A. Sofer and A. Danon (2000). "Translation of chloroplast *psbA* mRNA is modulated in the light by counteracting oxidizing and reducing activities." Mol Cell Biol **20**: 1116-1123.
- Vaistij, F. E., E. Boudreau, S. D. Lemaire, M. Goldschmidt-Clermont and J. D. Rochaix (2000b). "Characterization of Mbb1, a nucleus-encoded tetratricopeptide-like repeat protein required for expression of the chloroplast *psbB/psbT/psbH* gene cluster in *Chlamydomonas reinhardtii*." Proc Natl Acad Sci USA **97**: 14813-14818.
- Vaistij, F. E., M. Goldschmidt-Clermont, K. Wostrikoff and J. D. Rochaix (2000). "Stability determinants in the chloroplast *psbB/T/H* mRNAs of *Chlamydomonas reinhardtii*." Plant J **21**: 469-482.
- Vaistij, F. E., M. Goldschmidt-Clermont, K. Wostrikoff and J. D. Rochaix (2000a). "Stability determinants in the chloroplast *psbB/T/H* mRNAs of *Chlamydomonas reinhardtii*." Plant J **21**: 469-482.
- van Kooten, O. and J. F. H. Snel (1990). "The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology." Photosynth Res **25**: 147-150.
- Van Wijk, K. J., B. Andersson and E. M. Aro (1996). "Kinetic resolution of the incorporation of the D1 protein into photosystem II and localization of assembly intermediates in thylakoid membranes of spinach chloroplasts." J Biol Chem **271**: 9627-9636.

- Vogel, J., T. Börner and W. R. Hess (1999). "Comparative analysis of splicing of the complete set of chloroplast group II introns in three higher plant mutants." Nucl Acid Res **27**: 3866-3874.
- Westhoff, P. and R. G. Herrmann (1988). "Complex RNA maturation in chloroplasts. The *psbB* operon from spinach." Eur J Biochem **171**: 551-564.
- Westhoff, P., K. Offermann-Steinhard, M. Höfer, K. Eskins, A. Oswald and M. Streubel (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.
- Wollman, F. A., L. Minai and R. Nechushtai (1999). "The biogenesis and assembly of photosynthetic proteins in thylakoid membranes." Biochim Biophys Acta **1411**: 21-85.
- Yang, J. J., G. Schuster and D. B. Stern (1996). "CSP41, a sequence-specific chloroplast mRNA binding protein, is an endoribonuclease." Plant Cell **8**: 1409-1420.
- Yohn, C. B., A. Cohen, A. Danon and S. P. Mayfield (1996). "Altered mRNA binding activity and decreased translation initiation in a nuclear mutant lacking translation of the chloroplast *psbA* mRNA." Mol Cell Biol **16**: 3560-3566.
- Yohn, C. B., A. Cohen, A. Danon and S. P. Mayfield (1998). "A poly(A) binding protein functions in the chloroplast as a message-specific translation factor." Proc Natl Acad Sci USA **95**: 2238-2243.
- Zeltz, P., W. R. Hess, K. Neckermann, T. Börner and H. Kössel (1993). "Editing of the chloroplast *rpoB* transcript is independent of chloroplast translation and shows different patterns in barley and maize." EMBO J **12**: 4291-4296.
- Zerges, W. (2000). "Translation in chloroplasts." Biochimie **82**: 583-601.
- Zerges, W. and J. D. Rochaix (1998). "Low density membranes are associated with RNA-binding proteins and thylakoids in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*." J Cell Biol **140**: 101-110.
- Zerges, W., S. W. Wang and J. D. Rochaix (2002). "Light activates binding of membrane proteins to chloroplast RNAs in *Chlamydomonas reinhardtii*." Plant Mol Biol **50**(3): 573-585.

Eidesstattliche Erklärung

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

Krefeld, Juni 2004