

**Molekularbiologische und biochemische Analysen
zur Funktion des nukleären Hilfsfaktors HCF173
bei der Biogenese des Photosystems II
in *Arabidopsis thaliana***

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

vorgelegt von
Kerstin Melanie Schult
aus Neuss
2005

Aus dem Institut für Entwicklungs- und Molekularbiologie der Pflanzen
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

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

Referent: Prof. Dr. P. Westhoff

Koreferent: Prof. Dr. G. Groth

Tag der mündlichen Prüfung: 21.11.2005

Abkürzungen

ACA	ϵ -Aminocaprionsäure
Bis-Tris	2,2-Bis-(hydroxyethyl)-(iminotris)- (hydroxymethyl)methan
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
° C	Grad Celsius
CAPS	Cleaved Amplified Polymorphic Sequences
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
<i>Col</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i> Ökotyp <i>Columbia</i>
Ci	Curie
Cyt f	Cytochrom f
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSP	Dithiobis(succinimidylpropionat)
DTE	1,4-Dithioerythrit
DTSSP	Dithiobis(sulfosuccinimidylpropionat)
DTT	1,4-Dithiothreit
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Bis-(aminoethyl)-glycoether-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EST	Expressed Sequence Tags
<i>g</i>	Gravitationsbeschleunigung
g	Gramm
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
hcf	Hoch-Chlorophyll-Fluoreszenz (high chlorophyll fluorescence)
<i>HCF</i>	Bezeichnung des Gens / der RNA
HCF	Bezeichnung des Genproduktes
<i>hcf</i>	Bezeichnung der Mutante
Hepes	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethan-sulfonsäure
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
l	Liter
<i>Ler</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i> Ökotyp <i>Landsberg erecta</i>
M	molar
mA	Milliampere
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure
min	Minute
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid reduziert
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotidphosphat reduziert
nt	Nukleotide
OD	optische Dichte

Fortsetzung Abkürzungen

ORF	Open Reading Frame (offenes Leseraster)
P700	Chlorophyll a des Reaktionszentrums des Photosystems I
PAM	Pulsamplituden-Modulations-Fluorometer
PCR	Polymerasekettenreaktion
PNPase	Polynukleotidphosphorylase
RNA	Ribonukleinsäure
SDR	Short chain dehydrogenase/reductase
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SSLP	Simple Sequence Length Polymorphism
TAP	Twin Affinity Purification
T-DNA	Transfer-DNA
Tricin	<i>N</i> -Tris(hydroxymethyl)-methylglycin
Tris	<i>N</i> -Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Enzymeinheit
UE	Untereinheit
UpM	Umdrehungen pro Minute
UTR	untranslatierte Region
UV	ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
wt	Wildtyp

I.	Einleitung	1
1.	Der Chloroplast – Aufbau und Funktionen	1
2.	Die Evolution des Chloroplasten	2
3.	Die Regulation der Genexpression im Chloroplasten	3
3.1	Die Transkription	3
3.2	Die RNA-Reifung	5
3.3	RNA-Stabilität	7
3.4	Translation	10
4.	Die Photosynthesemutante <i>hcf173</i>	12
5.	Die Ziele dieser Arbeit	15
II.	Material und Methoden	16
1.	Material	16
1.1	Chemikalien und Enzyme	16
1.2	Bakterienstämme	16
1.3	Plasmide	16
1.4	Oligonukleotide	16
1.5	Saatgut	17
1.6	Antiseren	17
1.7	RNA-Sonden	17
1.7.1	Plasmid-Sonden	17
1.7.2	PCR-Sonden	18
2.	Pflanzenanzucht, Selektion von <i>hcf</i> -Mutanten und Segregationsanalysen	18
3.	Kopplungs- und Allelietest	19
4.	Transformation von Bakterien	19
5.	Plasmidisolierung aus Bakterien	19
6.	Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i>	20
7.	Spektroskopische Methoden	20
7.1	Analyse der Chlorophyll-Fluoreszenz-Induktion an Pflanzen von <i>Arabidopsis thaliana</i>	20
7.2	Messung der P700-Redoxkinetik an Blättern von <i>Arabidopsis thaliana</i>	21
8.	Computergestützte Sequenzanalysen	21
9.	Allgemeine molekularbiologische Methoden	21
10.	DNA-Analysen	22
10.1	Isolierung von DNA aus Einzelpflanzen	22
10.2	DNA-Amplifizierung durch die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	22
10.3	Kartierung des <i>HCF173</i> -Locus	23
10.4	Klonierung der <i>HCF173</i> cDNA und <i>HCF173</i> -Fusionsgene	25
10.5	PCR-basierte Genotypisierung von <i>hcf173</i> -Linien	26
10.6	Nachweis der <i>HCF173</i> -Fusionsgene	27
11.	RNA-Analysen	28
11.1	Isolierung von Gesamt- und Poly (A ⁺)-RNA	28

11.2	Reverse Transkription/cDNA-Herstellung	28
11.3	Northern-Analysen	29
11.4	Bestimmung von <i>HCF173</i> -Transkriptmengen in etiolierten und belichteten Keimlingen von <i>Arabidopsis thaliana</i> über Real-Time-PCR	30
12.	Proteinanalysen und biochemische Methoden	31
12.1	Bestimmung der Chlorophyllkonzentration	31
12.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	31
12.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	31
12.4	Färbung von SDS-Gelen	32
12.4.1	Coomassie-Färbung	32
12.4.2	Silberfärbung	33
12.5	Elektrotransfer von Proteinen	33
12.6	Immunodetektion von filtergebundenen Proteinen	33
12.7	Isolierung von Proteinen aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	34
12.8	<i>In vivo</i> -Markierung plastidärer Proteine und Immunopräzipitation von D1-Protein	34
12.9	Autoradiographie von radioaktiv markierten Proteinen	35
12.10	Isolierung von intakten Chloroplasten aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	35
12.11	Isolierung von Thylakoidmembranen aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	36
12.12	Fraktionierung von Chloroplasten in Stroma und Membranen und Salzwäsche von Chloroplastenmembranen	36
12.13	Solubilisierung plastidärer Proteine mit Hilfe von Digitonin	37
12.14	2D-(Blue Native-/SDS-) Gelelektrophorese	37
12.15	Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation plastidärer Membrankomplexe	38
12.16	Einsatz von quervernetzenden Agenzien zur Suche von HCF173-Interaktionspartnern	38
12.17	Affinitätschromatographie etikettierter HCF173-Proteine zur Identifizierung von Interaktionspartnern von HCF173	39
12.17.1	Affinitätschromatographie über IgG-Sepharose	40
12.17.1.1	Elution von HCF173-TAP durch Glycin, Natriumthiocyanat, SDS und Harnstoff	40
12.17.1.2	Elution von HCF173-TAP durch Inkubation mit TEV-Protease	41
12.17.2	Affinitätschromatographie über eine Calmodulin-Matrix	41
12.17.3	Affinitätschromatographie über eine Anti-HA-Matrix	42
12.17.4	Nachweis plastidärer Transkripte in den Eluaten der Anti-HA-Affinitätschromatographie	42
12.18	Hemmung der plastidären Translation durch Chloramphenicol und Lincomycin	43
III.	Ergebnisse	44
1.	Charakterisierung der Mutante <i>hcf173</i>	44
1.1	In der Mutante <i>hcf173</i> ist das Photosystem II defekt, das Photosystem I ist funktional	44
1.2	Die Transkriptmenge der <i>PsbA</i> -mRNA ist in <i>hcf173</i> stark reduziert	45
1.3	Die Synthese des D1-Proteins ist in der Mutante <i>hcf173</i> deutlich herabgesetzt	46
1.4	Die reduzierte Synthese des D1-Proteins beruht auf einem Defekt in der Stabilisierung der <i>PsbA</i> -RNA und/oder in den primären Prozessen der Translationsinitiation	48
2.	Isolierung des Gens <i>HCF173</i> und Komplementation des mutanten Phänotyps	50
2.1	Der <i>HCF173</i> -Locus wurde als das Gen At1g16720 identifiziert	50
2.2	Die <i>Arabidopsis thaliana</i> T-DNA-Insertionslinie 246C02 des GABI-Kat-Projektes repräsentiert das Allel <i>hcf173-2</i>	52

2.3	Die Transformation der Mutante <i>hcf173-1</i> mit der <i>HCF173</i> cDNA und zwei <i>HCF173</i> -Fusionsgenen komplementiert den mutanten Phänotyp	54
3.	Charakterisierung, Lokalisierung und Funktionsanalyse des Faktors HCF173	57
3.1	Das Protein HCF173 zeigt entfernte Ähnlichkeit zur Super-Familie der SDR-Proteine	57
3.2	Das Protein HCF173 ist mit den Membranen des Chloroplasten assoziiert	60
3.3	Nachweis von HCF173 als Teil eines höhermolekularen Komplexes	61
3.3.1	Solubilisierung von HCF173 mit Digitonin	61
3.3.2	Zentrifugation von solubilisierten Membranproteinen des Chloroplasten im linearen Saccharose-Dichtegradienten	62
3.3.3	Auftrennung von solubilisierten Membranproteinen über 2D-(Blue Native-/SDS-) Gelelektrophorese	64
3.3.4	Biochemische Quervernetzung von HCF173-Fusionsproteinen	66
3.4	Affinitätschromatographie zur Identifizierung von Interaktoren des HCF173-Proteins	69
3.4.1	IgG-/Calmodulin-Affinitätschromatographie	69
3.4.2	Anti-HA-Affinitätschromatographie	72
3.4.3	Nachweis plastidärer Transkripte in affinitätschromatographisch aufgereinigten Eluaten	74
3.5	Expression des <i>HCF173</i> -Gens während der Chloroplastenbiogenese im Keimling	75
IV.	Diskussion	78
1.	Die Mutante <i>hcf173</i> weist Defekte in der Translationsinitiation und/oder Stabilisierung der <i>PsbA</i> -RNA auf	79
2.	Studien zur Funktion des kernkodierten Biogenesefaktors HCF173	81
2.1	Klonierung des Gens <i>HCF173</i> und Komplementation des mutanten Phänotyps	81
2.2	Die Assoziation von HCF173 mit der Chloroplastenmembran	84
2.3	HCF173 ist Teil eines höhermolekularen Komplexes	86
2.4	Die zeitliche Expression von <i>HCF173</i>	89
3.	Welche Funktion übt HCF173 bzw. der HCF173-Komplex während der Biogenese des Photosystems II aus?	91
V.	Zusammenfassung	97
VI.	Anhang	99
VII.	Literatur	104

I. Einleitung

1. Der Chloroplast – Aufbau und Funktionen

Chloroplasten sind Zellorganellen der photoautotrophen Eukaryoten. Sie entwickeln sich im Licht aus undifferenzierten Proplastiden (Possingham, 1980). Im ausdifferenzierten Zustand weisen die Chloroplasten eine komplexe Struktur aus verschiedenen Membransystemen auf, die die Plastide in drei Kompartimente unterteilen. Der Intermembranraum befindet sich zwischen der äußeren und der inneren Hüllmembran, die gemeinsam den Chloroplasten vom Cytoplasma der Zelle abgrenzen und das Stroma umschließen. Im Stroma ist ein weiteres Membransystem zu finden, die sogenannten Thylakoide. Man unterscheidet bei den Thylakoiden zwischen ungestapelten Stromathylakoiden und den gestapelten Granathylakoiden. Das Thylakoidsystem umschließt das Lumen als drittes Kompartiment des Chloroplasten (Kirk, 1971; Nelson und Ben-Shem, 2004).

Die Hauptfunktion des Chloroplasten besteht in der Photosynthese. Dabei wird Lichtenergie in chemische Energie umgewandelt. Die lichtabhängigen Reaktionen zur Synthese von ATP und NADPH sind an die Thylakoidmembranen gebunden. In diese sind die vier großen Proteinkomplexe der photosynthetischen Elektronentransportkette Photosystem II (Ferreira et al., 2004), Cytochrom b_6f -Komplex (Stroebel et al., 2003), Photosystem I (Ben-Shem et al., 2003) und ATP-Synthase (Seelert et al., 2000) eingebettet. Durch Photonen angeregt findet im Photosystem II eine primäre Ladungstrennung am Chlorophyllpaar P680 statt. Pro Anregung wird ein Elektron frei. Die Elektronen werden auf der stromalen Seite auf Plastochinon übertragen und reduzieren es zu Plastochinol. Die Elektronenlücke am Chlorophyllpaar P680 wird durch Oxidation von Wasser im Wasserspaltungsapparat, der auf der luminalen Seite der Thylakoidmembran mit dem PS II assoziiert ist, wieder aufgefüllt. Hierbei entsteht Sauerstoff. Das Plastochinol diffundiert lateral in der Thylakoidmembran und transportiert die Elektronen zum Cytochrom b_6f -Komplex. Über diesen werden die Elektronen auf Plastocyanin übertragen, das auf der Lumenseite peripher an die Thylakoidmembran gebunden ist. Plastocyanin ist für den Transport der Elektronen zum Photosystem I verantwortlich. Hier füllen sie eine Elektronenlücke auf, die durch eine zweite photonenverursachte Ladungstrennung im Reaktionszentrum des Photosystems am Chlorophyllpaar P700 entstanden ist. Vom PSI werden die Elektronen an Ferredoxin abgegeben. Katalysiert durch die Ferredoxin-NADP-Reduktase reduziert Ferredoxin NADP^+ zu NADPH. Durch die Elektronentransportkette entstehen ein elektrochemisches Potential und ein Protonengradient über der Thylakoidmembran, die gemeinsam die sogenannte protonenmotorische Kraft bilden. Durch den Rückfluss der Protonen aus dem Lumen in das Stroma des Chloroplasten über die ATP-Synthase wird die Synthese von ATP aus ADP und anorganischem Phosphat angetrieben (zusammengefasst in Nelson und Ben-Shem, 2004). Die energiereichen Produkte ATP und NADPH der lichtabhängigen Reaktionen der Photosynthese werden zum Teil im Calvin-Zyklus (Dunkelreaktion) wieder verbraucht, um CO_2 aus der Atmosphäre zu fixieren und Kohlenhydrate zu synthetisieren. Der Calvin-Zyklus findet im Gegensatz zur Lichtreaktion im Stroma des Chloroplasten statt (Calvin, 1962; Wolosiuk et al., 1993).

2. Die Evolution des Chloroplasten

Chloroplasten sind semiautonome Zellorganellen cyanobakteriellen Ursprungs. Laut Endosymbiontentheorie entstanden sie durch die Aufnahme eines cyanobakterienähnlichen Prokaryoten in einen einzelligen Eukaryoten (Mereschkowsky, 1905; Douglas, 1998). Während die Genome heute vorkommender Cyanobakterien eine Vielzahl an proteinkodierenden Genen beinhalten (*Nostoc punctiforme* 7432 ORFs (Meeks et al., 2001), *Synechocystis* sp. Stamm PCC6803 3168 ORFs (Kaneko et al., 1996)), weisen die Plastome der heutigen Chloroplasten nur noch wenige solcher Gene auf (*Arabidopsis thaliana* 87 ORFs (Sato et al., 1999), *Chlamydomonas reinhardtii* 99 ORFs (Maul et al., 2002), *Zea mays* 104 ORFs (Maier et al., 1995)). Ein Großteil der ursprünglich prokaryotischen Gene wurde durch horizontalen Gentransfer in den Zellkern des eukaryotischen Organismus verlagert oder ging vollständig verloren (Martin et al., 1998; Martin et al., 2002; Timmis et al., 2004). Die im Chloroplasten verbliebenen Gene kodieren hauptsächlich Strukturproteine des Photosyntheseapparates und Komponenten der Transkriptions- und Translationsmaschinerie. Laut der CORR-Hypothese (*co-location for redox regulation*) ist die Genexpression dieser Gene abhängig vom Redoxzustand des Chloroplasten und der Transfer der Gene in den Zellkern bisher unterbunden worden (Allen, 2003).

Die Auslagerung der plastidären Gene in den Zellkern hat zur Folge, dass die Genprodukte in den Chloroplasten transportiert werden müssen. Aktuelle Abschätzungen gehen davon aus, dass etwa 3100 Proteine in den Chloroplasten importiert werden. Von rund 1300 wird angenommen, dass sie cyanobakteriellen Ursprungs sind (Martin et al., 2002; Leister, 2003). Man vermutet, dass in etwa weitere 3000 Proteine aus *Arabidopsis thaliana* von cyanobakteriellen Proteinen abstammen, die ihre Funktion in den Mitochondrien, in der Proteinsekretion und anderen Abläufen ausüben (Martin et al., 2002; Leister, 2003).

Wie oben erwähnt, müssen plastidäre Proteine, die im Zellkern kodiert sind, an ihren Wirkungsort befördert werden. Zu diesem Zweck sind die Proteine an ihrem N-Terminus mit einem Transitpeptid ausgestattet und werden über den Toc/Tic-Apparat durch die Hüllmembranen transportiert (Jarvis und Soll, 2002). Ein weiterer Transport innerhalb des Chloroplasten in das Thylakoidlumen oder die Insertion in die Thylakoidmembran wird über mindestens vier verschiedene Wege bewerkstelligt (zusammengefasst in Robinson et al., 2001). Zwei davon regeln den Import in das Thylakoidlumen. Dieser geschieht entweder unter ATP-Verbrauch über das Sec-Translokon oder über den Δ pH abhängigen Weg der *Twin-Arginine-Translokation* (TAT). Im ersten Fall werden die Proteine im ungefalteten Zustand transportiert, während über den TAT-Mechanismus die gefalteten Substrate befördert werden (Hynds et al., 1998). Für beide Wege wird eine weitere N-terminale Signalsequenz für den Transport benötigt (Hynds et al., 1998). Für die Insertion integraler Proteine in die Thylakoidmembran stehen ebenfalls zwei Möglichkeiten zur Verfügung. Zum einen der GTP-abhängige *Signal Recognition Pathway* (SRP), der eingehend anhand der LHCP-Familie (*light-harvesting chlorophyll a/b-binding protein*) untersucht wurde (zusammengefasst in Schünemann, 2004), und zum anderen die spontane Insertion. Während für die spontane Insertion Signalsequenzen im N-Terminus des Vorläuferproteins und des später reifen Proteins benötigt werden (Thompson et al., 1999; Tissier et al., 2002), liegt die Information für die Insertion über den SRP-Mechanismus wohl in der Aminosäuresequenz des reifen LHC-Proteins (Lamppa, 1988; Viitanen et al., 1988). Der

Weg der spontanen Proteininsertion scheint ein neu erworbener Transportweg des Chloroplasten zu sein. Die übrigen drei Mechanismen zeigen Ähnlichkeiten zu prokaryotischen Abläufen und stammen von dem cyanobakteriellen Vorläufer, aus dem sich der Chloroplast entwickelte (Yuan et al., 1994; Li et al., 1995; Bogsch et al., 1998; Wexler et al., 1998).

3. Die Regulation der Genexpression im Chloroplasten

Der Gentransfer zum Zellkern während der evolutionären Entwicklung des Chloroplasten hat zur Folge, dass sich unter anderem die photosynthetischen Proteinkomplexe der Thylakoidmembran aus plastidär- und nukleärkodierten Untereinheiten zusammensetzen (Herrmann et al., 1985; Wollman et al., 1999). Damit ist eine Koordination der Genexpression von Plastom und Kerngenom für die Biogenese und Erhaltung der Thylakoidmembran unerlässlich. Bei der Regelung dieser Prozesse spielen kernkodierte Faktoren eine große Rolle (Goldschmidt-Clermont, 1998; Barkan und Goldschmidt-Clermont, 2000). Einige von ihnen konnten durch die Charakterisierung von nukleären Mutanten aus Mais (Barkan et al., 1994; Williams und Barkan, 2003), *Arabidopsis thaliana* (Meurer et al., 1996a; Meurer et al., 1998; Felder et al., 2001; Lennartz et al., 2001; Meierhoff et al., 2003) und *Chlamydomonas reinhardtii* (Rochaix et al., 1989; Vaistij et al., 2000b; Dauvillee et al., 2003), die Defekte in der Chloroplastenbiogenese und -funktion aufweisen, identifiziert werden.

Die plastidäre Genexpression bietet zahlreiche Möglichkeiten, die Biogenese der Thylakoidmembran zu regulieren. Der Eingriff kernkodierter regulierender Faktoren kann bei der Transkription, auf posttranskriptioneller Ebene (RNA-Prozessierung, -Edierung und -Stabilität), bei der Translation und auf Ebene posttranslationeller Reifungs- und Assemblierungsprozessen geschehen.

3.1 Die Transkription

Die Transkription plastidärkodierter Proteine wird von zwei unterschiedlichen RNA-Polymerasen übernommen, die als PEP (*plastid encoded RNA-polymerase*) und NEP (*nuclear encoded RNA-polymerase*) bezeichnet werden (Maliga, 1998; Hess und Börner, 1999). Die plastidärkodierte Polymerase setzt sich aus mehreren Untereinheiten zusammen, die Ähnlichkeiten mit Untereinheiten der eubakteriellen RNA-Polymerase aufweisen. Die Promotoren zeigen Übereinstimmungen mit typischen Promotoren mit $-35'$ (TTGACA)- und $-10'$ (TATAAT)-Motiven aus *Escherichia coli* (Igloi und Kössel, 1992). Die Ansteuerung der Promotoren durch die PEP kann zum Beispiel durch Licht, den Entwicklungsstand des Chloroplasten und den Typ der Plastide beeinflusst werden (Allison, 2000). Man geht davon aus, dass dies durch verschiedene in Zeit und Raum differentiell exprimierte sigmafaktorenähnliche Proteine verwirklicht wird, die an die Promotersequenzen binden (Gross et al., 1998). Diese Polypeptide sind variable Untereinheiten der PEP und im Gegensatz zu den übrigen Untereinheiten im Kerngenom kodiert (Allison, 2000). Sie konnten zunächst aus Rotalgen isoliert werden (Tanaka et al., 1996; Oikawa et al., 1998), wurden

aber mittlerweile auch in *Arabidopsis thaliana* (Kanamaru et al., 1999; Fujiwara et al., 2000), Mais (Tan und Troxler, 1999; Lahiri und Allison, 2000), Senf (Kestermann et al., 1998), *Sorghum bicolor* (Kroll et al., 1999), Reis (Tozawa et al., 1998) und Weizen (Morikawa et al., 1999) identifiziert. Für die Faktoren AtSig5 und AtSig6 aus *Arabidopsis thaliana* wird eine Rolle in der lichtabhängigen Transkription bzw. in den Chloroplasten des Keimlingsstadiums vermutet (Kanamaru und Tanaka, 2004; Ishizaki et al., 2005). Die Spezifität der sigmafaktoren-ähnlichen Proteine wird wahrscheinlich, wie oben erwähnt, durch differentielle Expression garantiert, aber vermutlich auch durch verschiedene Varianten der $-35'$ - und $-10'$ -Promotor-Motive (Allison, 2000; Hakimi et al., 2000). Die Aktivität dieser Faktoren wird anscheinend über Phosphorylierung reguliert, möglicherweise auch über den Redoxzustand von Plastocyanin (Maliga, 1998; Baginsky et al., 1999; Pfannschmidt et al., 1999).

Die nukleärcodierte Polymerase besteht im Gegensatz zur PEP aus nur einer Untereinheit und ähnelt der T3-/T7-Bakteriophagen-Polymerase (Lerbs-Mache, 1993; Liere und Maliga, 1999). Sie wurde zunächst aus Spinat als ein 110 kDa großes Protein isoliert (Lerbs-Mache, 1993). Inzwischen konnten das Enzym bzw. die Gene des Enzyms auch in *Arabidopsis thaliana* (Hedtke et al., 1997), Weizen (Ikeda und Gray, 1999), Mais (Chang et al., 1999), Reis (Kusumi et al., 2004) und Gerste (Emanuel et al., 2004) identifiziert werden. Die Promotoren, die von dieser Polymerase angesteuert werden, zeigen keinerlei Ähnlichkeiten zu denen der eubakteriellen Polymerase. Die NEP-abhängigen Promotoren weisen zwar konservierte Motive auf, aber keines von ihnen ist einheitlich in jedem Promoter zu finden (Weihe und Börner, 1999).

Während die nukleärcodierte Polymerase hauptsächlich Hauswirtschaftsgene für Transkription und Translation (z.B. *rpoB*-Operon, *accD*) (Hajdukiewicz et al., 1997; Hess und Börner, 1999) transkribiert, ist die plastidärcodierte Polymerase zuständig für die Expression der Photosynthesegene (z.B. *PsbA*) (Allison et al., 1996). Es gibt allerdings auch Gene, die von beiden Polymerasen transkribiert werden, da sie für beide die erforderlichen Promotoren aufweisen (z.B. *atpB*-Transkriptionseinheit) (Allison et al., 1996; Hajdukiewicz et al., 1997).

Es wird angenommen, dass die kernkodierte Polymerase hauptsächlich in nicht-grünen Plastiden aktiv ist, so zum Beispiel in meristematischem Gewebe. Die Funktion kann im Fall der doppelten Promotorausstattung dann nachfolgend von der plastidärcodierten Polymerase übernommen werden (Mullet, 1993; Hajdukiewicz et al., 1997; Hess und Börner, 1999).

Die Regulation der Genexpression auf Ebene der Transkription zeigt sich in der unterschiedlichen Transkriptionsaktivität einiger plastidärcodierter Gene. So konnte in Gerste gezeigt werden, dass sich die Transkriptionsraten bis zum 300-fachen unterscheiden (Rapp et al., 1992). Die Transkriptionsaktivität der einzelnen plastidären Gene allerdings verändert sich während der lichtabhängigen Chloroplastenbiogenese jedoch in den meisten Fällen nicht. Die durch Licht induzierte erhöhte RNA-Akkumulation beruht eher auf einer Veränderung der RNA-Stabilitäten. Dies konnte durch einen Vergleich der Transkriptionsraten und RNA-Spiegel in etiolierten und grünen Blättern von Spinat und Gerste demonstriert werden (Deng und Gruissem, 1987; Klein und Mullet, 1987). Somit kommt der posttranskriptionellen Regelung der Expression plastidärer Gene eine große Bedeutung zu.

3.2 Die RNA-Reifung

Neu synthetisierte Transkripte müssen für die Proteinbiosynthese in eine translatierbare Form gebracht werden. Dazu sind die verschiedensten Reifungsprozesse nötig. Viele plastidäre Gene werden in polycistronischen Einheiten transkribiert und im Anschluss durch endo- und exonukleolytische Prozesse in monocistronische Einheiten überführt (zusammengefasst in Sugita und Sugiura, 1996; Monde et al., 2000). Dies ist nötig, da eventuelle Sekundärstrukturen die Translationsinitiation verhindern können. So konnten in Tabak in einem *in vitro* Translationssystem weder das *PsaC*- noch das *NdhD*-Genprodukt von der dicistronischen Transkriptionseinheit synthetisiert werden, da vermutlich eine *PsaC* kodierende Region und eine Region aus dem 5'-untranslatierten Bereich von *NdhD* Basenpaarungen ausbilden (Hirose und Sugiura, 1997). An der intercistronischen Prozessierung sind kernkodierte Faktoren beteiligt, wie an nukleären Mutanten aus *Chlamydomonas reinhardtii*, *Arabidopsis thaliana* und Mais gezeigt werden konnte. In der Mutante *ac20* aus *Chlamydomonas reinhardtii* akkumulieren unprozessierte 23S-RNA Transkripte. Als Folge davon werden im Chloroplasten keine Ribosomen assembliert (Holloway und Herrin, 1998). In den Mais-Mutanten *Cps1* und *Hcf7* ist ebenfalls die Prozessierung ribosomaler RNAs beeinträchtigt (Barkan, 1993).

Die Abläufe der intercistronischen Prozessierung überlappen in vielen Fällen mit den Reifungsprozessen der 5'- und 3'-untranslatierten Regionen (UTR) der Transkripte. So wird der aus Mais isolierte, nukleäre Faktor CRP1 für die intercistronische Prozessierung zwischen der *PetB*- und der *PetD*-RNA benötigt, die gleichzeitig das in der Vorläufer-RNA basengepaarte Startcodon für die Translation freistellt (Barkan et al., 1994). Aus *Arabidopsis thaliana* konnten zwei Faktoren isoliert werden, die an der intercistronischen Prozessierung und Reifung der RNAs des *PsbB*-Operons beteiligt sind. HCF152 ist ein Protein der PPR- (Pentatricopeptide-Repeat-) Familie und zeigt strukturelle, jedoch keine sequenzspezifischen Ähnlichkeiten zu CRP1. HCF152 spielt eine Rolle bei der Prozessierung zwischen den Genen *PsbH* und *PetB* des *PsbB*-Operons (Meierhoff et al., 2003). HCF107 gehört zu der Familie der TPR- (Tetratricopeptide-Repeat-) Proteine. Es ist an der Prozessierung zwischen den Genen *PsbN* und *PsbH* beteiligt und zeigt einen spezifischen Defekt in der Akkumulation aller 5'-prozessierten *PsbH*-Transkripte (Felder et al., 2001; Sane et al., 2005). Aus *Chlamydomonas* konnte das zu HCF107 orthologe Protein Mbb1 isoliert werden (Vaistij et al., 2000b).

Dass die Reifung der 5'-UTRs eine wichtige Rolle für die Translatierbarkeit der Transkripte spielt, konnte an Studien mit *Chlamydomonas reinhardtii* demonstriert werden. Sowohl die *PsbA*- als auch die *PsbD*-Transkripte der Alge weisen zwei verschieden lange 5'-Bereiche auf. Bei Mutationsanalysen stellten sich nur die kürzeren und abundanteren Transkripte als translatierbar heraus (Bruick und Mayfield, 1998; Nickelsen et al., 1999). An der Prozessierung der 5'-UTR der *PsbA*-RNA scheinen Faktoren beteiligt zu sein, die die Ribosomenassoziation mit der RNA vermitteln (Bruick und Mayfield, 1998). Die Reifung der 5'-Enden wird wahrscheinlich durch einen endonukleolytischen Schnitt und möglicherweise anschließender 5'→3'-Trimmung bewerkstelligt, wie anhand von Untersuchungen mit der *PetD*-RNA aus *Chlamydomonas reinhardtii* festgestellt wurde (Sakamoto et al., 1994a; Drager et al., 1999). Widersprüchlich stellt sich die Situation in höheren Pflanzen dar. Hier zeigte sich, dass zwar auch verschieden lange Transkripte des *PsbA*-Gens existieren,

allerdings ist hier die häufigste Form die längere RNA. Prozessierung durch Schnitte in der 5'-UTR leiten die Degradation der RNA ein (Klaff et al., 1997; Shen et al., 2001). Für die Translation der *PsbH*-RNA scheint hingegen ihre Prozessierung an Position -45 bezüglich des Startcodons essentiell zu sein. Es wird vermutet, dass auf diese Weise eine Haarnadelstruktur in der 5'-UTR der *PsbH*-RNA aufgelöst wird und das Transkript so in eine translatierbare Form überführt wird. An diesem Prozess scheint das bereits erwähnte kernkodierte Protein HCF107 beteiligt zu sein (Felder et al., 2001; Sane et al., 2005).

Neben den 5'-Enden unterliegen, wie bereits erwähnt, auch die 3'-Enden der plastidären RNAs gewissen Reifungsprozessen. Einen Grund dafür stellt die häufig ineffiziente Beendigung der Transkription im Chloroplasten dar (Stern und Gruissem, 1987; Rott et al., 1996). Anhand von detaillierten Untersuchungen der *AtpB*-RNA von *Chlamydomonas reinhardtii* zeigte sich, dass in der Grünalge die Reifung des 3'-Endes eine Voraussetzung für die Translatierbarkeit des Transkriptes ist. So sind nur korrekt prozessierte Transkripte mit Polysomen besetzt (Rott et al., 1998a). Im Gegensatz dazu stehen die Erkenntnisse hinsichtlich der Reifung des 3'-Endes plastidärer Transkripte in höheren Pflanzen. So sind in *Arabidopsis thaliana* unprozessierte *PsbA*- und *RbcL*-Transkripte mit Polysomen besetzt und die Translation ist nicht beeinflusst (Walter et al., 2002). Die Reifung des 3'-Endes wird durch einen endonukleolytischen Schnitt eingeleitet, dem ein weiteres exonukleolytisches Zurechtschneiden folgt (Stern und Kindle, 1993).

Für die Trimmung der RNA durch Exonukleasen scheint es gleichgültig zu sein, wo die Transkription beendet oder wo die RNA endonukleolytisch geschnitten wurde (Stern et al., 1991; Rott et al., 1999). In den letzten Jahren konnten einige kernkodierte Faktoren identifiziert werden, die an den Reifungsprozessen beteiligt zu sein scheinen. Dazu zählt CRP3 aus *Chlamydomonas reinhardtii*, dem eine allgemeine Rolle während der 3'-Prozessierung plastidärer Transkripte zugesprochen wird (Levy et al., 1999). In Senfpflanzen scheint eine 54 kDa große Endonuklease an der Reifung verschiedener Transkripte beteiligt zu sein. Das Protein p54 bindet an die 3'-UTRs der *rps16*-, *trnK*- und *trnH*-RNA. Seine Aktivität wird dabei über Phosphorylierung und den Redoxzustand kontrolliert (Nickelsen und Link, 1991, 1993; Liere und Link, 1997). Die Aufgabe des exonukleolytischen Abbaus während der Reifungsprozesse übernimmt in höheren Pflanzen die Polynukleotidphosphorylase (PNPase), die später noch im Zusammenhang mit der RNA-Degradation diskutiert wird (Hayes et al., 1996; Walter et al., 2002). Ein allgemein für die Reifung notwendiges Protein scheint ein Ribonukleoprotein von 28 kDa zu sein (RNP28 oder cp28), das neben anderen Proteinen dieser Familie auch für die RNA-Stabilität ribosomenfreier RNAs sorgt. Die Funktionsweise von RNP28 ist jedoch noch nicht bekannt (Schuster und Gruissem, 1991; Hayes et al., 1999; Nakamura et al., 2001).

Eine weitere Möglichkeit, die Genexpression im Chloroplasten posttranskriptionell auf Ebene der RNA-Reifung zu kontrollieren, bietet das Spleißen. Viele plastidäre Gene enthalten Introns, die vor der Translation aus den Vorläufer-RNAs entfernt werden müssen. Diese Introns gehören in Algen und höheren Pflanzen den Gruppen I und II an, wobei höhere Pflanzen hauptsächlich Introns der Gruppe II aufweisen und Algen im Fall von *Chlamydomonas reinhardtii* Introns der Gruppe I (Monde et al., 2000). Trotz Beobachtungen autokatalytischen Spleißens in *in vitro* Versuchen (Saldanha et al., 1993) wird in Hinsicht auf

die nicht physiologischen Versuchsbedingungen davon ausgegangen, dass für das Entfernen der Intronsequenzen nukleärcodierte Faktoren benötigt werden. Dies konnte anhand von Untersuchungen verschiedener Suppressormutanten aus *Chlamydomonas reinhardtii* für die Gruppe I-Introns der *PsbA*-RNA und 23S-rRNA bestätigt werden (Li et al., 2002). Für das Spleißen der Gruppe II-Introns der *PsaA*-RNA aus *Chlamydomonas reinhardtii* werden mindestens 14 kernkodierte Genprodukte beansprucht. Davon wurden drei Faktoren (Raa1, Raa2 und Raa3) molekular identifiziert und näher charakterisiert (Perron et al., 1999; Rivier et al., 2001; Perron et al., 2004). Auch in höheren Pflanzen sind kernkodierte Faktoren bekannt, die in das Intronspleißen der Gruppe II-Introns eingreifen. Aus Mais konnten die Proteine Crs1 und Crs2 isoliert werden. Ersteres ist spezifisch in den Spleißprozess des Introns aus dem *atpF*-Transkript involviert, während Crs2 am Spleißen neun verschiedener plastidärer Introns beteiligt ist (Jenkins et al., 1997). Die Struktur von Crs2 konnte vor kurzem durch Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt werden (Ostheimer et al., 2005). Durch die Interaktion mit den Faktoren Caf1 bzw. Caf2 wird Crs2 eine gewisse Intronspezifität zugewiesen (Ostheimer et al., 2003). Sowohl Caf1 und Caf2 als auch Crs1 weisen ein basisches Motiv in ihrer Sequenz auf, das zwei bis drei Mal wiederholt wird und an der RNA-Bindung beteiligt ist. Man nimmt an, dass diese Motive die Intronspezifität vermitteln (Till et al., 2001; Ostheimer et al., 2003).

Als letzte Möglichkeit, auf die plastidäre RNA-Reifung Einfluss zu nehmen, ist die Edierung zu nennen. Bei der Edierung im Chloroplasten wird in den meisten Fällen ein Cytosin gegen ein Uracil ausgetauscht (Tsudzuki et al., 2001). In Tabak sind bis heute 34 Edierungsstellen bekannt (Sasaki et al., 2003). Sinn der Edierung ist in den meisten Fällen die Erhaltung konservierter Aminosäuren, um die Funktionalität der Proteine zu gewährleisten (Bock et al., 1994; Zito et al., 1997; Sasaki et al., 2003), oder die Herstellung eines Startcodons für die Translation (Hoch et al., 1991; Hirose und Sugiura, 1997). Es gibt aber auch Vermutungen, dass möglicherweise die Edierungsrate einen Einfluss auf die Aktivität von Enzymen hat (Hirose et al., 1999) oder aber auch die Erhaltung wichtiger RNA-Sekundärstrukturen garantiert (Miyamoto et al., 2002). Wie die Edierung exakt funktioniert, ist nicht bekannt. Allerdings ist auch dieser Prozess von kernkodierten Faktoren abhängig, die zum Teil an *cis*-Elemente der Edierungsstellen binden können (Hirose und Sugiura, 2001; Miyamoto et al., 2004). Vor kurzem ist es gelungen einen Faktor aus *Arabidopsis thaliana* zu isolieren, der spezifisch an der Edierung des *ndhD*-Startcodons beteiligt ist. Das Protein CRR4 gehört zu der Proteinfamilie der PPR-Proteine, die, wie bereits erwähnt, in der Lage sind, RNA zu binden. Es wird vermutet, dass CRR4 die Edierungsmaschinerie an die Edierungsstelle lotst (Kotera et al., 2005).

3.3 RNA-Stabilität

Durch die Reifung wurden die plastidären Transkripte in eine translatierbare Form überführt. Über die RNA-Stabilität und Translation als weitere posttranskriptionelle Regulationsmechanismen wird im Folgenden gewährleistet, dass der Bedarf an neu synthetisierten Proteinen gedeckt wird.

Die differentielle RNA-Stabilität ist, wie oben beschrieben, hauptverantwortlich für die unterschiedliche Akkumulation plastidärer Transkripte (Deng und Grissem, 1987; Klein und Mullet, 1987). Als Maß für die RNA-Stabilität dienen die Halbwertszeiten der Transkripte, die zum Teil sehr unterschiedlich sein können. So weist in Gerstekeimlingen die *PsaA*-RNA mit einer Halbwertszeit von etwa 6 Stunden die geringste Stabilität auf und das *PsbA*-Transkript mit etwa 40 Stunden die höchste (Kim et al., 1993). Die RNA-Stabilität ist abhängig von Entwicklungsprozessen, wie der Blattentwicklung (Klaff und Grissem, 1991; Kim et al., 1993) und der Reifung des Chloroplasten. Während der lichtinduzierten Chloroplastenbiogenese wird zum Beispiel die Akkumulation der *PsbA*-Transkripte deutlich durch die Erhöhung der Transkriptstabilität gesteigert (Kim et al., 1993).

Vermittelt wird die RNA-Stabilität plastidärer Transkripte über die 5'- und 3'-untranslatierten Bereiche (*cis*-Elemente) und daran bindende Proteine (*trans*-Elemente). In den 3'-Enden nahezu aller plastidären RNAs sind invertierte Sequenzwiederholungen zu finden, die dazu in der Lage sind, Haarnadelstrukturen auszubilden. Sie schützen die RNA vor exonukleolytischem Abbau in 3'→5'-Richtung (Stern und Grissem, 1987; Stern et al., 1989; Rott et al., 1998b). Der 3'-UTR kommt im Gegensatz zur 5' untranslatierten Region eine eher allgemeine Funktion für die RNA-Stabilisierung zu. Durch Transformation von *Chlamydomonas reinhardtii*-Chloroplasten mit RNA-Konstrukten konnte dargelegt werden, dass Konstrukte mit gleichen 5'-UTRs und unterschiedlichen 3'-UTRs dieselbe Stabilität aufweisen, während dies bei Konstrukten mit unterschiedlichen 5'-UTRs und gleichen 3'-UTRs nicht der Fall ist (Blowers et al., 1993). Allerdings konnten in Gerste auch zwei 37 bzw. 38 kDa große Proteine als *trans*-Elemente der RNA-Stabilisierung in der 3'-UTR identifiziert werden, die spezifisch die *PsbA*-RNA binden und den Transkripten zusätzliche Stabilität verleihen könnten (Memon et al., 1996).

Wie oben bereits angedeutet, kommt der 5'-UTR bei der Regelung der differentiellen RNA-Stabilität eine große Bedeutung zu. Die Stabilitätskontrolle durch diesen Bereich ist bisher hauptsächlich in *Chlamydomonas reinhardtii* untersucht worden (Higgs et al., 1999; Nickelsen et al., 1999; Vaistij et al., 2000a). So konnten in den UTRs plastidärer Transkripte Bereiche identifiziert werden, die für die RNA-Stabilität wichtig sind und durch stabilisierende Proteine gebunden werden. Zum Teil stellen dafür sekundäre RNA-Strukturen ein wichtiges Element (Higgs et al., 1999; Zou et al., 2003) dar. Für die *PsbD*-RNA konnte gezeigt werden, dass das kernkodierte TPR-Protein Nac2 als Teil eines großen Komplexes an diesen essentiellen Bereich bindet. Man geht davon aus, dass der Komplex den Abbau des Transkriptes durch 5'→3'-Exonukleasen verhindert (Nickelsen et al., 1999).

Das oben bereits erwähnte Mbb1-Protein scheint neben seiner Aufgabe in der Prozessierung auch wichtig für die Stabilität der *psbB/T/H*-Transkripte zu sein (Vaistij et al., 2000a).

Neben den Proteinen, die an spezifische RNAs binden, konnten aus Tabak fünf plastidäre Ribonukleoproteine isoliert werden (cp28, cp29A, cp29B, cp31 und cp33) (Li und Sugiura, 1990; Ye et al., 1991), die sequenzunspezifisch an viele Transkripte binden können. Ihnen obliegt hauptsächlich die Stabilisierung ribosomenfreier RNAs (Nakamura et al., 2001). Homologe Proteine konnten in verschiedenen Pflanzenspezies identifiziert werden, unter

anderem auch in Spinat (Schuster und Gruissem, 1991) und *Arabidopsis thaliana* (Ohta et al., 1995).

Als *in trans* wirksame Faktoren müssen neben Proteinkomponenten auch Co-Faktoren genannt werden. So konnte in *in vitro* Degradationsversuchen gezeigt werden, dass Magnesiumionen einen stabilisierenden Effekt auf die *PsbA*-RNA aus Spinat haben können (Klaff, 1995; Horlitz und Klaff, 2000).

In direktem Zusammenhang mit der RNA-Stabilität steht die Degradation plastidärer Transkripte. Durch *in vitro* Experimente anhand der *PsbA*-RNA aus Spinat und der *PetD*-RNA aus Tabak konnte dargelegt werden, dass der RNA-Abbau durch endonukleolytische Schnitte eingeleitet wird (Klaff, 1995; Bollenbach et al., 2003), die in den untranslatierten Bereichen und der kodierenden Region platziert werden können (Klaff, 1995; Yang und Stern, 1997). Die Fragmente, die durch den endonukleolytischen Schnitt entstehen, werden zunächst erneuten endonukleolytischen Prozessen unterworfen oder aber direkt mit einem Poly(A)-Schwanz versehen (Lisitsky et al., 1996). Dieser hat im Gegensatz zu den Poly(A)-Sequenzen der eukaryotischen Transkripte keine stabilisierende Wirkung (Kudla et al., 1996), sondern markiert die RNA-Fragmente für die weitere Degradation durch eine 3'→5' Exonuklease (Lisitsky et al., 1997).

Als Endonukleasen, die die primären Schnitte durchführen, werden mehrere Proteine diskutiert. Eines dieser Proteine ist p67, das aus Spinatchloroplasten isoliert wurde. Es zeigt Ähnlichkeit zur RNase E, die in Bakterien die RNA-Degradation initiiert (Kuwano et al., 1977; Ono und Kuwano, 1979). Die *in vitro* Schnittstellen dieses Proteins in der *PsbA*-RNA, stimmen mit den *in vivo* aufgezeigten Polyadenylierungsstellen überein (Klaff, 1995; Kudla et al., 1996). Ob p67 diese Funktion auch *in vivo* übernehmen kann, ist ungeklärt. Als zweite Endonuklease wird das kernkodierte und hochabundante Protein CSP41a diskutiert. CSP41a ist in seiner Aminosäuresequenz stark konserviert und gehört zu der Familie der SDR-Proteine (short chain dehydrogenases/reductases) (Baker et al., 1998). Dieses Protein wurde als Teil eines Komplexes mit CSP29 und CSP55 isoliert und seine Aufgabe im Zusammenhang mit den Reifungsprozessen der 3' untranslatierten Region diskutiert (Yang et al., 1996). Neueren Erkenntnissen zufolge jedoch scheint es nur an der Initiation von RNA-Degradationsprozessen beteiligt zu sein (Bollenbach et al., 2003). CSP41a schneidet sequenzunspezifisch, allerdings sind die Schnittstellen meist in Haarnadelstrukturen enthalten. So werden die *PetD*-, *RbcL*- und *PsbA*-RNAs in den Sekundärstrukturen ihrer 3' untranslatierten Regionen geschnitten (Yang und Stern, 1997; Bollenbach und Stern, 2003a).

Als weitere Endonukleasen werden CSP41b, ein zu CSP41a paraloges Protein, und das an den Reifungsprozessen der 3'-UTR teilhabende p54 aus Senf vermutet (Bollenbach et al., 2004). Letzteres wird vor allen Dingen im Zusammenhang mit einem lichtunabhängigen Weg der RNA-Degradation diskutiert, in dem CSP41 keine Wirkung zu entfalten scheint. P54 bietet durch seine redox- und phosphorylierungsgesteuerte Aktivität eine Alternative (Bollenbach et al., 2004).

Sowohl die Polyadenylierung der endonukleolytisch entstandenen Fragmente, als auch ihr exonukleolytischer Abbau werden im Chloroplasten von der Polynukleotidphosphorylase (PNPase) bewerkstelligt, die ihre Wirkung als Homotrimer entfaltet (Baginsky et al., 2001; Yehudai-Resheff et al., 2001). Die Aufgabenverteilung wird durch verschiedene strukturelle Domänen des Proteins ermöglicht (Yehudai-Resheff et al., 2003) und möglicherweise

dynamisch über das P_i:NDP-Verhältnis reguliert (Yehudai-Resheff et al., 2001). Experimente mit *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen, denen durch Mutation die PNPase fehlt, konnten demonstrieren, dass die Polyadenylierungsreaktion anscheinend auch von einem zweiten Protein bzw. Proteinkomplex übernommen werden kann (Walter et al., 2002). Über weitere Exonukleasen, die am RNA-Abbau beteiligt sind, kann im Moment nur spekuliert werden. So könnte es zum Beispiel einen poly(A)-unabhängigen Weg der RNA-Degradation durch RNase II geben, wie er in Organismen existiert, die keine PNPase-Aktivität aufweisen (Bollenbach et al., 2004). Des Weiteren wird das Vorhandensein einer 5'→3' Exonuklease diskutiert. Eine solche Aktivität konnte bisher nur in *Chlamydomonas reinhardtii* gezeigt werden; ein Gen, das ein solches Enzym kodiert, konnte jedoch noch nicht isoliert werden (Drager et al., 1999; Bollenbach et al., 2004).

3.4 Translation

Die Translation stellt ein wichtiges regulatorisches Element in der Genexpression des Chloroplasten dar und wird durch externe Faktoren, wie zum Beispiel Licht, und den Entwicklungsstand der Pflanze beeinflusst.

Die Regulation findet hauptsächlich durch *cis*-Elemente in den 5'-UTRs und Faktoren, die an diese Elemente binden, statt. Aus diesem Grund zeigt sich oft eine sehr enge Verknüpfung mit der Regulation über RNA-Stabilität. Viele Faktoren, die essentiell für die Translation sind, beeinflussen auch die Stabilität der plastidären Transkripte. Umgekehrt ermöglichen Faktoren, die RNAs stabilisieren, erst die Proteinsynthese. Von daher ist eine Unterscheidung zwischen diesen Mechanismen oft sehr schwierig.

Die Translationsmaschinerie des Chloroplasten zeigt noch eine deutliche Verwandtschaft zu der der Eubakterien. So gehören zu ihr zum Beispiel die 5S-, 16S- und 23S-rRNAs, zu eubakteriellen Translationsinitiations- und Elongationsfaktoren homologe Proteine und homologe ribosomale Proteine (zusammengefasst in Harris et al., 1994; Sugiura et al., 1998). Allerdings hat sich die Maschinerie im Laufe der Evolution weiterentwickelt und zeigt Anpassungen an das eukaryotische System. Es zeigte sich, dass die „Shine-Dalgarno“ (SD)-Sequenz, die in den Eubakterien die Assoziation der kleinen Untereinheit des Ribosoms über die 16S-rRNA an die zu translatierende RNA vermittelt, entbehrlich geworden ist. Zwar benötigen die plastidären Transkripte *PsbA* und *PsbD* aus *Chlamydomonas reinhardtii* eine SD-ähnliche Sequenz zur effektiven Proteinbiosynthese (Mayfield et al., 1994; Nickelsen et al., 1999), andere Transkripte, wie zum Beispiel *PetD*, jedoch nicht (Sakamoto et al., 1994b). Es wurde postuliert, dass weitere *cis*-Elemente und kernkodierte Faktoren für die Rekrutierung der Ribosomen nötig und verantwortlich sind. Durch die Entwicklung eines *in vitro* Translationssystems konnte gezeigt werden, dass auch für die Translation der *PsbA*-RNA in Tabak keine typische SD-Sequenz mehr nötig ist (Hirose und Sugiura, 1996). Vielmehr konnten drei andere für die Translationsinitiation wichtige *cis*-Elemente identifiziert werden. Die beiden Elemente RBS1 und RBS2 sind komplementär zum 3'-Ende der 16S-rRNA und werden von einem AU-reichen Element unterbrochen. Man geht davon aus, dass die AU-reiche Region im ungepaarten Teil einer Haarnadelstruktur liegt und in der Lage ist, mit *in trans* wirkenden Faktoren zu interagieren, während RBS1 und RBS2 wie eine zweiteilige SD-Sequenz mit der 16S-rRNA wechselwirken, um die kleine Untereinheit der

Ribosomen zu rekrutieren (Hirose und Sugiura, 1996). Die starke Konservierung der 5'-UTR in höheren Pflanzen (Shen et al., 2001) lässt eine solche Regulierung auch für *Arabidopsis thaliana*, Spinat, Reis und Gerste vermuten. In höheren Pflanzen konnte bisher nur für die *rps14*-RNA belegt werden, dass sie eine SD-ähnliche Sequenz für die Translation benötigt.

Als allgemeine Faktoren der Translationsinitiation wurden aus Spinat und *Chlamydomonas reinhardtii* die Proteine CS1 bzw. CreS1 isoliert. Sie sind Teil der 30S Untereinheit der plastidären Ribosomen und stellen Homologe des ribosomalen S1-Proteins aus *E. coli* dar. Das S1-Protein erkennt pyrimidinreiche Abschnitte in den 5' untranslatierten Bereichen der bakteriellen Transkripte und ist zusätzlich zur Interaktion zwischen 16S-rRNA und SD-Sequenzen an der Rekrutierung der kleinen Ribosomen-Untereinheit beteiligt (Boni et al., 1991; Ringquist et al., 1995). Die plastidären Äquivalente weisen Affinität zu uracilreichen Sequenzen auf, die mit der Anzahl der Uracilreste steigt. Man geht davon aus, dass die Spezifität der Bindung durch weitere kernkodierte Proteine unterstützt wird. Im Gegensatz zum eubakteriellen Protein weisen die CS1 und CreS1 nur drei statt sechs S1-RNA-Bindemotive auf (Franzetti et al., 1992a; Yamaguchi et al., 2002).

Wie anhand der *PetD*-RNA aus *Chlamydomonas reinhardtii* gezeigt werden konnte, können *cis*-Elemente als unstrukturierte RNA wirken, während andere Elemente sekundäre und möglicherweise tertiäre Strukturen ausbilden. Es wird vermutet, dass Sekundärstrukturen in der Lage sind, Proteine zu binden, die aktivierend auf die Translation wirken. Das bestuntersuchtete Beispiel stellt hierfür sicherlich die *PsbA*-RNA aus *Chlamydomonas reinhardtii* dar. Die Haarnadelstruktur in der 5'-UTR (Mayfield et al., 1994) bindet in Abhängigkeit von Licht einen Komplex, der vier Hauptproteine enthält (Danon und Mayfield, 1991, 1994; Yohn et al., 1996). Zu diesen Proteinen zählen RB47, ein poly (A)-bindendes Protein, die Disulfidisomerase RB60, RB38, das an uracilreiche Sequenzen binden kann, sowie RB55. Bis auf RB55 konnten alle Gene kloniert und näher charakterisiert werden (Kim und Mayfield, 1997; Yohn et al., 1998a; Barnes et al., 2004). RB60 ist in der Lage, die Bindeaktivität von RB47 zu steuern, indem es den Redoxzustand des Proteins verändert (Fong et al., 2000; Kim und Mayfield, 2002). Bisher vermutete man, dass RB60 durch Reduktion von RB47 dessen Bindeaktivität erhöht und somit die Ribosomenassoziation und die Translationsinitiation fördert. Kürzlich wurde jedoch das kernkodierte Protein Tba1 aus *Chlamydomonas reinhardtii* isoliert, das eben diese Aufgabe zu übernehmen scheint (Somanchi et al., 2005). Das von Tba1 benötigte Redoxpotential wird wahrscheinlich durch die lichtabhängigen Reaktionen der Photosynthese bereitgestellt. Aufgrund der Entdeckung von Tba1 und dem hohen Oxidationspotential von Disulfidisomerasen wird neuerdings spekuliert, ob RB60 eher als Inaktivator der Translation und somit als Gegenspieler von Tba1 funktioniert (Somanchi et al., 2005). Gene für die Faktoren RB47, RB60, und Tba1 konnten auch in *Arabidopsis thaliana* identifiziert werden (Shen et al., 2001; Somanchi et al., 2005). Da RB47 mit den Plastidenmembranen niedrigerer Dichte (LD-Membranes) assoziiert ist (Zerges und Rochaix, 1998), nimmt man an, dass dieses Protein zur Translation der *PsbA*-RNA bei der Neusynthese des Photosystems II beiträgt.

Zusätzlich zu diesen Proteinen wurde mit RBP63 ein weiterer nukleärer Faktor in *Chlamydomonas reinhardtii* identifiziert, der mit hoher Spezifität eine adeninreiche Region in der 5'-UTR des *PsbA*-Transkriptes binden kann. Dieser jedoch ist ausschließlich mit den Stromathylakoiden assoziiert. Somit liegt die Vermutung nahe, dass RBP63 eine wichtige Rolle bei der D1-Synthese zur Reparatur lichtgeschädigter Photosysteme einnimmt.

Möglicherweise leitet es das *PsbA*-Transkript an die Stromathylakoide und fördert dort die Assemblierung der Ribosomen (Ossenbühl et al., 2002).

Neben diesen Proteinen hat man viele weitere kernkodierte *trans*-Faktoren isoliert, die über eine direkte oder indirekte Wechselwirkung mit den verschiedensten plastidären Transkripten spezifisch die Initiation der Translation regeln (zusammengefasst in Barkan und Goldschmidt-Clermont, 2000; Zerges, 2000; Nickelsen, 2003).

Sicherlich ist die Regulation der Translation über die Translationsinitiation am bedeutendsten. Dennoch stellen auch die Translationselongation und –termination Angriffspunkte für regulatorische Mechanismen da. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass die Synthese eines vollständigen D1-Proteins in Abhängigkeit von Licht (Klein und Mullet, 1987; Klein et al., 1988; van Wijk und Eichacker, 1996), der Verfügbarkeit von Co-Faktoren, wie Chlorophyll und Reduktionsäquivalenten (Mullet et al., 1990; Zhang et al., 2000), und Assemblierungspartnern geschieht (de Vitry et al., 1989). Aus *Arabidopsis thaliana* konnte ein kernkodierter Faktor isoliert werden, der spezifisch bei der Termination der Translation von Transkripten mit UGA-Stop-Codons benötigt wird (Meurer et al., 2002).

Im Anschluss an die Translation oder während der Translation, zum Beispiel bei cotranslationalem Einbau der synthetisierten Proteine in die Thylakoidmembran, werden die Produkte gefaltet, eventuelle Co-Faktoren eingebaut und die Proteinuntereinheiten zu Proteinkomplexen assembliert. In diese Prozesse, sowie in die Prozesse des Proteintransportes greifen ebenfalls nukleärkodierte Biogenesefaktoren ein (Meurer et al., 1998; Cline und Mori, 2001; Lennartz et al., 2001; Plücken et al., 2002).

4. Die Photosynthesemutante *hcf173*

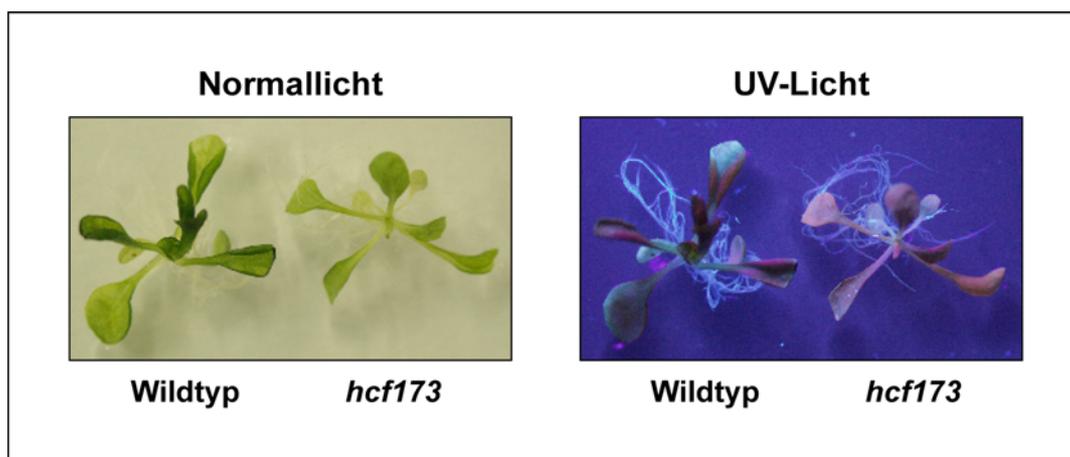


Abb. 1: Wildtyp und *hcf173*-Mutante im Weißlicht und UV-Licht. Die Mutante zeigt im Weißlicht einen blasseren Phänotyp als der Wildtyp. Unter UV-Licht leuchtet die Mutante rötlich auf.

Bei der Biogenese photosynthetischer Proteinkomplexe der Thylakoidmembran spielen kernkodierte Proteine eine regulatorische Rolle. Zur Identifizierung solcher Faktoren hat sich der vorwärts-gerichtete genetische Ansatz als nützlich erwiesen (Felder et al., 2001; Kroll et

al., 2001; Lennartz et al., 2001; Plücker et al., 2002; Meierhoff et al., 2003). Aus der Nachkommenschaft mit EMS- oder T-DNA mutagenisierten Saatguts werden Pflanzen selektiert, die einen Defekt in der Photosynthese aufweisen (Bechtold et al., 1993; Meurer et al., 1996b). Dieser Defekt macht sich aufgrund einer Störung im photosynthetischen Elektronentransport durch eine erhöhte Chlorophyllfluoreszenz bemerkbar. Die Mutanten werden daher als *hcf*- (high chlorophyll fluorescence)-Mutanten bezeichnet (Miles, 1982). Ihre Selektion erfolgt anhand ihres rötlichen Phänotyps im UV-Licht. Auf diese Weise wurde unter anderem die Mutante *hcf173* (alte Bezeichnung: C52) isoliert.

Die Mutante *hcf173* ist blasser und kleiner als eine wildtypische Pflanze und zeigt im UV-Licht die typische erhöhte Chlorophyllfluoreszenz (Abb. 1). Die immunologische Analyse der plastidären Proteinspiegel (Abb. 2, in Absprache mit Dr. K. Meierhoff gezeigt) wies auf ein defektes Photosystem II in der Mutante hin. So sind die plastidärkodierte Untereinheiten D1, D2, CP43 und CP47 in *hcf173* nicht oder kaum nachweisbar. Die Menge an Cytochrom b_{559} ist auf etwa 25 % des Wildtypniveaus reduziert, die kernkodierte 23 kDa und 34 kDa Untereinheiten auf etwa 12,5 %. Die Untereinheiten des Photosystems I sind in der Mutante auf etwa 20 – 50 % des Wildtypspiegels herabgesetzt. Allerdings konnte gezeigt werden, dass dies auf Sekundäreffekten beruht (Plücker et al., 2002). Die Assimilation der Polypeptide des Cytochrom b_6f -Komplexes und der ATPase ist in der Mutante nicht eingeschränkt.

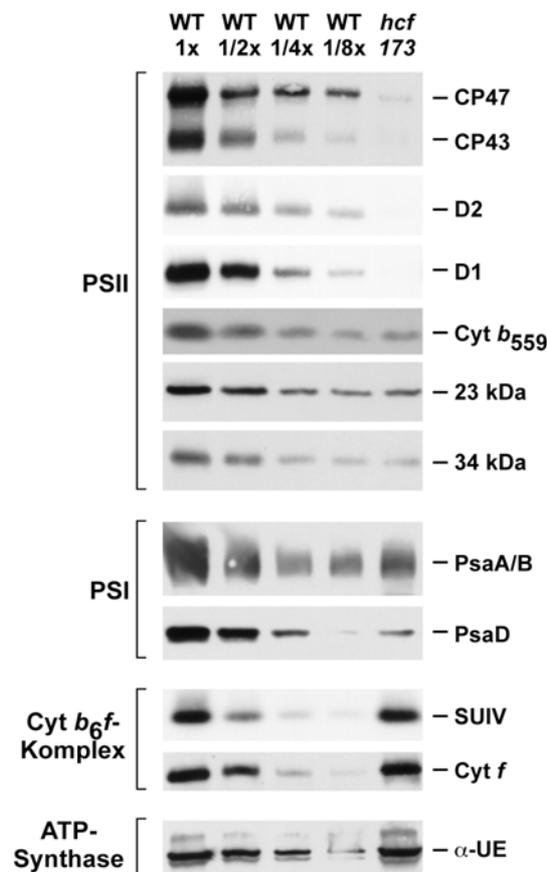


Abb. 2: Immunoblotanalyse plastidärer Membranproteine aus Wildtyp- bzw. *hcf173*-Pflanzen. 20 μ g bzw. die angegebenen Verdünnungen Membranproteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulose übertragen. Die angegebenen Proteine wurden mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Ergebnisse in Absprache mit Dr. K. Meierhoff gezeigt.

Bei der Untersuchung der Transkriptpegel plastidär und kernkodierter Untereinheiten der photosynthetischen Komplexe (*AtpA*, *PetA*, *PetD*, *PsaA*, *PsaF*, *PsbA*, *PsbB* und *PsbD*) wurde eine drastische Reduktion der *PsbA*-mRNA auf etwa 25 % des Wildtypniveaus und eine leichte Reduktion der *PsaA*-mRNA auf ca. 70 % des Wildtypniveaus in *hcf173* deutlich (Abb. 3). Die verringerte Akkumulation des *PsbA*-Transkriptes ist auf seine verminderte Stabilität zurückzuführen. Die *in vivo*-Halbwertszeit der *PsbA*-mRNA ist in der Mutante etwa um den Faktor acht reduziert (Töller, 1999).

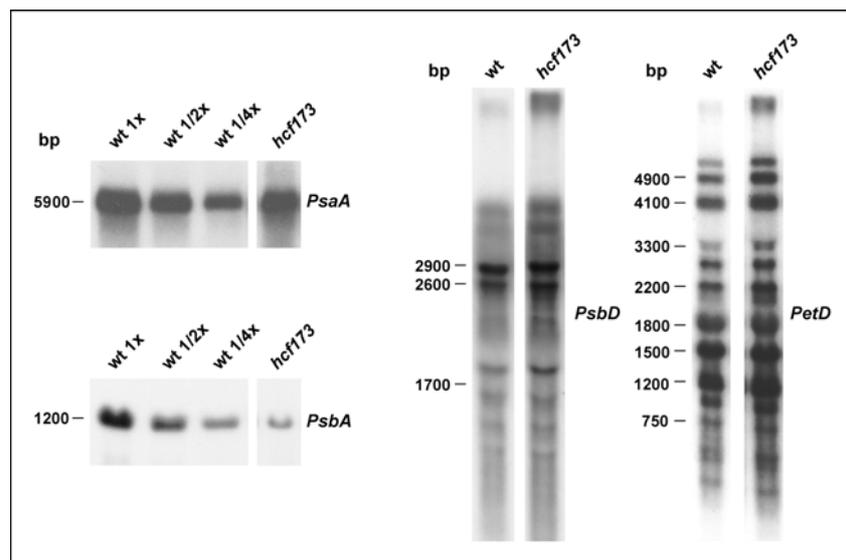


Abb. 3: Analyse plastidärer Transkripte von Wildtyp-Pflanzen und *hcf173*-Mutanten. Sechs Mikrogramm bzw. die angegebenen Verdünnungen Gesamt-RNA drei Wochen alter Wildtyp-Pflanzen bzw. *hcf173*-Mutanten wurden durch denaturierende Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit genspezifischen radioaktiv markierten Sonden hybridisiert. Ergebnisse in Absprache mit Dr. K. Meierhoff gezeigt.

Da die Mutante *hcf173* durch EMS-Mutagenese erzeugt wurde, wird ihr *hcf*-Phänotyp durch eine Punktmutation im Genom hervorgerufen. Der Locus der Mutation muss somit über markergestützte Positionsklonierung identifiziert werden. Bisher wurde das Gen *HCF173* durch eine Grobkartierung (durchgeführt von Dr. K. Meierhoff und S. Paradies) mit Hilfe der Kombination einzelner molekularer Marker zweier Markersets (Konieczny und Ausubel, 1993; Bell und Ecker, 1994) und homozygot mutanten Keimlingen der F₂-Generation einer Kartierungspopulation auf dem oberen Arm von Chromosom 1 lokalisiert. Durch Herstellung neuer Marker und weitere Charakterisierung von 428 Familien der F₃-Generation, die jeweils ein F₂-Individuum der Kartierungspopulation repräsentierten, konnte der *HCF173*-Locus bisher auf einen Bereich von etwa 470 kb zwischen den molekularen Markern SNP634 und SNP397 (= m59) lokalisiert werden (Abb. 4).

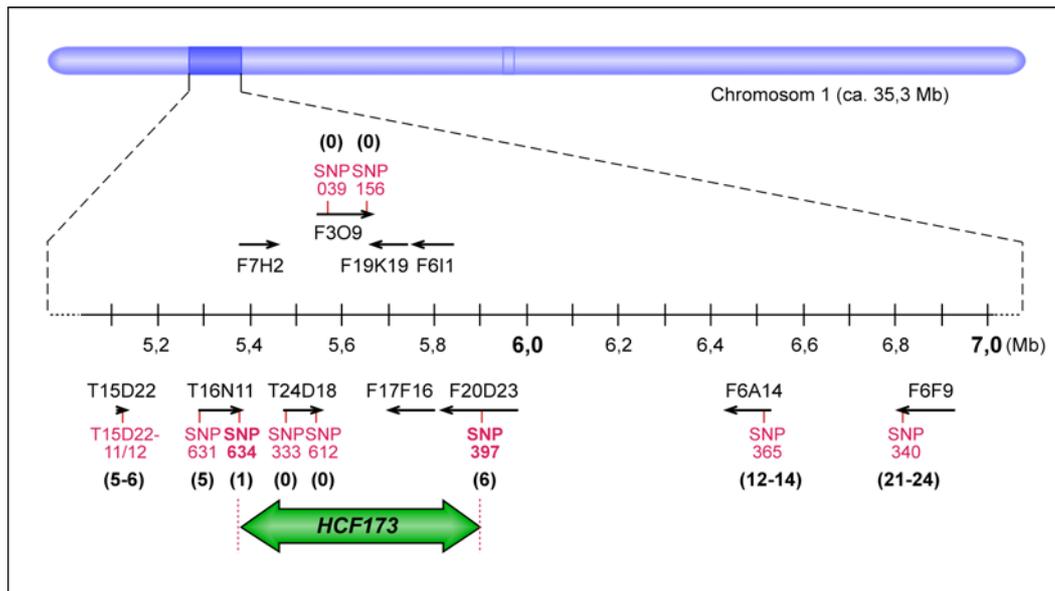


Abb. 4: Bisherige Kartierung des *HCF173*-Locus. Der Locus *HCF173* (grüner Pfeil) wurde mit Hilfe von 428 Individuen zwischen den PCR-Markern (rot) SNP634 (BAC-Klon T16N11) und SNP397 (BAC-Klon F20D23) auf dem oberen Arm von Chromosom 1 kartiert. Die Zahlen in den Klammern geben die Anzahl der Rekombinationsereignisse an, die bezüglich des verwendeten Markers detektiert wurden.

5. Die Ziele dieser Arbeit

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente sollten zum Verständnis der Biogeneseprozesse des Photosystems II beitragen. Zu diesem Zweck sollte die Photosynthesemutante *hcf173* molekularbiologisch und biochemisch eingehender charakterisiert werden. Die ersten Ergebnisse hinsichtlich der spektroskopischen Untersuchungen und Transkriptanalysen sollten verifiziert bzw. vervollständigt werden. Da die Mutante *hcf173* über EMS-Mutagenese hergestellt wurde, stand zudem die Isolation des *HCF173*-Gens über markergestützte Positionsklonierung aus. Die Identität von *HCF173* sollte über Komplementation des mutanten Phänotyps mit der entsprechenden cDNA bestätigt werden. Zusätzliche Komplementationsstudien mit Fusionsproteinen, bestehend aus dem HCF173-Protein und einem Proteinetikett, sollten Einblicke in die Lokalisation von HCF173 geben. Mit Hilfe der Proteinetiketten sollten zudem über den biochemischen Ansatz der Affinitätschromatographie mit dem HCF173-Protein interagierende Komponenten isoliert werden, um die Funktion von HCF173 aufzuklären.

II. Material und Methoden

1. Material

1.1 Chemikalien und Enzyme

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien besaßen in der Regel p.a.-Qualität und wurden, sofern nicht anders vermerkt, von den Firmen Baker (Deventer, Niederlande), Biomol (Hamburg), Difco Laboratories (Detroit, USA), Fluka (Buchs, Schweiz), Invitrogen (Karlsruhe) Janssen Chimica (Beerse, Belgien), Merck (Darmstadt), Riedel-de-Haën (Seelze), Roth KG (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma-Aldrich (München) bezogen.

Enzyme und dazugehörige Komponenten stammten von den Firmen BD Biosciences Clontech (Mountain View, USA), MBI Fermentas (St. Leon-Rot), Roche (Mannheim) und Stratagene (Heidelberg).

Nukleotide für PCR-Reaktionen wurden von MBI Fermentas (St. Leon-Rot) bezogen. Radioaktiv markierte Nukleotide stammten von GE Healthcare (früher Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden).

1.2 Bakterienstämme

E. coli DH5 α (Bethesda Research Laboratories, 1986)

E. coli SCS110 (Stratagene, Heidelberg)

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

1.3 Plasmide

Für Standardklonierungen wurde der Vektor pBluescript KSII+ (Stratagene, Heidelberg) eingesetzt. Für die direkte Klonierung von PCR-Fragmenten wurde der Vektor pCR2.1-TOPO (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Klonierungen zur Transformation von *Agrobacterium tumefaciens* und *Arabidopsis thaliana* wurden mit dem Vektor pPEX001 (freundlicherweise von Dr. Bernd Reiss, MPIZ Köln, zur Verfügung gestellt) vorgenommen. Dieser trägt Gene, die den transformierten Bakterien eine Carbenicillin-/Ampicillin-Resistenz und den transformierten Pflanzen eine Phosphinotricin-Resistenz (= Bastaresistenz) verleihen. Zur Isolierung der DNA-Sequenzen für die Proteinetikettierung dienten die Plasmide pBS1479 und Spa1g3xHA-pBS (freundlicherweise von Dr. Ute Höcker, Universität Düsseldorf zur Verfügung gestellt), die die Sequenzen für den TAP-Tag (pBS1479, Puig et al., 2001) und den Tripel-HA-Tag nach Sato und Wada (1997) enthielten.

1.4 Oligonukleotide

Eine Auflistung der verwendeten Oligonukleotide ist im Anhang zu finden.

1.5 Saatgut

Die Mutante *hcf173-1* (alte Bezeichnung C52) entstammt einer Sammlung von EMS-Mutanten, die nach Meurer et al. (1996b) hergestellt und isoliert wurden. Die Kartierungspopulation wurde durch Kreuzung der Mutante mit dem Wildtyp-Ökotypen *Landsberg erecta* hergestellt. Für die Kartierung wurden die Linien Ler x C52-1 Kreuzung 1a-12 und -20 verwendet. Neben diesem Saatgut wurde auch Saatgut vom Wildtyp-Ökotyp *Columbia* freundlicherweise von Dr. K. Meierhoff (Düsseldorf) zur Verfügung gestellt. Die T-DNA-Insertionslinie 246C02 (*hcf173-2*) entstammt der Sammlung des GABI-Kat Projektes des Max-Planck-Institutes für Züchtungsforschung in Köln (Rosso et al., 2003).

1.6 Antiseren

Tab. 1: Verwendete Antiseren

Antigen / Spezies	Hersteller / Referenz
PS I-A/B (<i>PsaA/B</i>) / Spinat	G. Armstrong, K. Apel, ETH, Zürich, Schweiz
PS I-D (<i>PsaD</i>) / Spinat	R. Nechushtai, Hebrew University, Jerusalem, Israel
D1 (<i>PsbA</i>) / Gerste	J. Mullet, P. Gamble, Texas A&M-University, USA
D2 (<i>PsbD</i>) / Gerste	J. Mullet, P. Gamble, Texas A&M-University, USA
CP43 (<i>PsbC</i>) / Gerste	J. Mullet, P. Gamble, Texas A&M-University, USA
CP47 (<i>PsbB</i>) / Spinat	U. Johannigmeier, Universität Halle
Cyt f (<i>PetA</i>) / Spinat	N. Nelson, Universität Tel Aviv, Israel
UE IV (<i>PetD</i>) / Spinat	R. J. Berzborn, Ruhr-Universität Bochum
Rubisco-L (<i>RbcL</i>) / <i>Chlorogonium elongatum</i>	P. Westhoff, Universität Düsseldorf
Anti-HA, HA.11	BabCO, Berkeley, Kalifornien, USA
Anti-HA, Peroxidase Konjugat	Roche, Indianapolis, USA
PAP	Sigma Saint Louis, Missouri, USA

1.7 RNA-Sonden

1.7.1 Plasmid-Sonden

Tab. 2: Verwendete Plasmid-Sonden

Sonde	Klon/Vektor	Fragment	Hersteller/Referenz
<i>PsaA</i>	W3	BamHI / KpnI	Westhoff et al., 1991
<i>PsaC</i>	pR668HSI	HindIII / EcoRI	K.Steinmüller
<i>PsbA</i>	pSoP2520.3	PstI / XbaI	Westhoff et al., 1991
<i>PsbB</i>	pSoP1927	EcoRI / XbaI	Westhoff und Herrmann, 1988
<i>PsbC</i>	E4	BamHI / SacI	Westhoff et al., 1991
<i>PsbE/F</i>	pSoP2203	EcoRI	Westhoff et al., 1991
<i>PsbO</i>	pc1H5T7P	Sall / NotI	ABRC ¹
<i>PsbP</i>	pcB63TP	EcoRI	ABRC ¹

¹Arabidopsis Biological Resource Center, Ohio State University Columbus, Ohio, USA

1.7.2 PCR-Sonden

Tab. 3: Verwendete PCR-Sonden / Angabe der Primer, die zur Herstellung der Sonden verwendet wurden

Sonde	Primerpaar
16S	16S-H / 16S-R
At1g16610	At1g16610-H2 / At1g16610-R1
At1g16630	At1g16630-H2 / At1g16630-R1
At1g16720	At1g16720-H1 / At1g16720-R1
AtpF	AtpF-H / AtpF-R
PetB	PetB-H2 / PetB-R2
PsaC	PsaC-H/ PsaC-R
PsbA	PsbA5´-H / PsbA-R3
PsbB	PsbB5´-H/PsbB5´-R
PsbE	PsbE-H / PsbE-R
PsbH	PsbH-HM / PsbH-R
RbcL	RbcL-H / RbcL-R

2. Pflanzenanzucht, Selektion von *hcf*-Mutanten und Segregationsanalysen

Die Anzucht von *Arabidopsis thaliana* auf Floraton I-Erde (Floragard, Oldenburg) erfolgte bei 21-23°C unter Langtag- (16h/8h Licht-/Dunkelrhythmus) bzw. Kurztagbedingungen (8h/16h Licht-/Dunkelrhythmus) in einer Klimakammer. Die Lichtintensität betrug 50-80 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (Leuchtstoffröhren Fluora L58W/77, Natura de Luxe L58W/76, Osram, Berlin). Für Selektionsanalysen wurden die Keimlinge alle zwei Tage mit einer Herbizidlösung (10-20 mg/l Basta; freundlicherweise von der Fa. Hoechst (Frankfurt) zur Verfügung gestellt) besprüht bzw. gegossen. Zur Saatgutgewinnung wurde das Arasystem der Firma Beta Tech (Gent, Belgien) genutzt.

Für die sterile Pflanzenanzucht wurde das *Arabidopsis thaliana*-Saatgut für 5 Minuten mit 25 % (v/v) Danklorix (Colgate-Palmolive GmbH, Hamburg) und 0,02 % (v/v) Triton oberflächensterilisiert und anschließend 5 mal mit sterilem Wasser gewaschen. Die Aussaat erfolgte auf 1/2 MS-Medium (Murashige und Skoog, 1962) [1 % (w/v) Saccharose; 0,5 g/l MES/NaOH, pH 5,7; 2,35 g/l MS Salze; 0,3 % (w/v) Gelrite] in Petrischalen. Für Selektionsanalysen wurden dem Medium wahlweise 10 mg/l Basta oder 11,25 mg/l Sulfadiazin (Sigma-Aldrich, München) beigefügt. Die Anzucht der Keimlinge wurde in einem Anzuchtschrank bei 23 °C, 50-80 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (Lumilux L36W/11 Tageslichtröhren) und einem 16h/8h Licht-/Dunkelrhythmus durchgeführt. Zur Synchronisation wurde das auf Erde oder Medium ausgelegte Saatgut für mindestens 48 h bei 4°C aufbewahrt. Die Sichtung der Mutanten mit Hilfe einer UV-Handlampe (Fluotest Forte 180 W, Heraeus, Hanau) erfolgte bei der Aussaat auf Erde nach ca. 5-6 Tagen, bei der Aussaat auf Medium nach ca. 14 Tagen.

3. Kopplungs- und Allelietest

Die Linie 246C02 einer Sammlung von T-DNA Insertionslinien (GABI-KAT, MPIZ Köln, (Rosso et al., 2003) zeigte unter UV-Licht den *hcf*-Phänotyp. Die Linie wies laut Herstellerangaben nur eine inserierte T-DNA auf, die in Exon 3 des Gens At1g16720 lokalisiert war. Um dies und die Kopplung der T-DNA mit dem *hcf*-Phänotyp zu überprüfen, wurde Saatgut zweier hinsichtlich des *hcf*-Phänotyps aufspaltenden T3-Generationen (246C02-T3-2 und -T3-7) auf sulfadiazinhaltiges (11,25 mg/l) 1/2 MS-Medium ausgelegt.

Für einen Allelietest wurden heterozygote *hcf173*-Pflanzen aus einer aufspaltenden T3-Linie der Kartierungspopulation und heterozygote Pflanzen einer aufspaltenden Linie der T3-Generation von 246C02 miteinander gekreuzt. Die Pflanzen wurden wie unter Punkt II.10.5 erläutert genotypisiert. Die Kreuzungen wurden sowohl mit *hcf173* (Kreuzungsansatz A) als auch mit 246C02 (Kreuzungsansatz B) als Mutterpflanze durchgeführt. Die Nachkommenschaft der Kreuzungen wurde auf Aufspaltung bezüglich des *hcf*-Phänotyps gesichtet.

4. Transformation von Bakterien

Die Transformation gefrierkompetenter *E. coli* DH5 α Zellen wurde entsprechend dem Protokoll von Hanahan (Hanahan et al., 1991) durchgeführt. Zur Selektion positiver Klone wurde LB-Medium (10 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Hefe-Extrakt, 10 g/l NaCl; pH 7,2) mit Antibiotikum (Ampicillin 50-100 μ g/ml) versetzt.

Die Transformation elektrokompenter *Agrobacterium tumefaciens* Bakterien des Stammes GV3101 (pMK90RK) (Koncz et al., 1994) wurde durch Elektroporation nach Herstellerangaben im Electro Cell Manipulator 600 (ITC Biotechnology, Heidelberg) durchgeführt. Zur Selektion positiver Klone wurde YEB-Medium (5 g/l Fleisch-Extrakt, 1 g/l Hefe-Extrakt, 5 g/l Pepton, 5 g/l Saccharose, 2 mM MgCl₂) mit den benötigten Antibiotika (Carbenicillin 100 μ g/ml, Rifampicin 100 μ g/ml, Kanamycin 25 μ g/ml) versetzt.

5. Plasmidisolierung aus Bakterien

Zur Isolierung größerer Mengen von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen wurde das Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979) angewendet und die Nukleinsäuren über JetStar-Säulen (Genomed, Bad Oeynhausen) aufgereinigt. Für die Isolierung kleinerer Mengen Plasmid-DNA wurde die Methode der Kochlyse (Holmes und Quigley, 1981) oder die alkalische Lyse ohne anschließende Säulenaufreinigung eingesetzt. Nur für Sequenzierungen und Transformationen wurden Plasmide mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kits (Qiagen, Hilden) aufgereinigt.

6. Transformation von *Arabidopsis thaliana*

Zur Transformation von *Arabidopsis thaliana* mit Hilfe von *Agrobacterium tumefaciens* wurde die Floral Dip-Methode eingesetzt (Clough und Bent, 1998). Zu diesem Zweck wurden heterozygote und daher auf Erde lebensfähige *hcf173* Pflanzen angezogen. Ca. 4-5 Tage vor der Transformation wurden die primären Infloreszenzen entfernt, um die Proliferation sekundärer Blütentriebe zu fördern. Idealerweise besaßen die Pflanzen Blüten, die kurz vor der Öffnung standen.

Die Agrobakterien einzelner positiver Klone wurden zunächst in 4 ml Vorkulturen (YEB-Medium, Carbenicillin 100 µg/ml, Rifampicin 100 µg/ml, Kanamycin 25 µg/ml) auf einem Schüttler (200 UpM) bei 28°C angezogen. Nach 1 – 2 Tagen konnten diese auf größere Kulturen (500 ml) überimpft werden. Nach dem Wachstum bis hin zur stationären Phase ($OD_{600} \approx 2$) wurden die Bakterien für 10 Minuten bei 3500 UpM im GSA-Rotor sedimentiert und in 5 % (w/v) Saccharose und 0,05 % (v/v) Silwet-L77 resuspendiert. Die *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen wurden für einige Sekunden kopfüber in die Bakteriensuspensionen getaucht und dabei leicht hin und her bewegt, so dass die kompletten Pflanzen mit einem Film der Lösung benetzt waren. Um eine hohe Luftfeuchtigkeit während der nächsten 24 h zu gewährleisten, wurden die Pflanzen mit Autoklavierbeuteln oder Plastikhauben bedeckt. Die weitere Kultivierung der transformierten Pflanzen und die anschließende Saatguternte erfolgten unter Standardbedingungen. Die Nachkommen wurden, wie unter Punkt II.2 beschrieben, durch Segregationsanalysen mit dem Herbizid Basta (=Phosphinotricin) auf Erde oder unter sterilen Bedingungen auf Anwesenheit der transformierten T-DNA überprüft. Das Wachstum von Agrobakterien auf den MS-Nährböden konnte durch Zugabe von 200 mg/l Endkonzentration Claforan (Hoechst, Frankfurt) unterdrückt werden.

7. Spektroskopische Methoden

7.1 Analyse der Chlorophyll-Fluoreszenz-Induktion an Pflanzen von *Arabidopsis thaliana*

Die *in vivo* Chlorophyll a-Fluoreszenz von 3 Wochen alten *Arabidopsis thaliana*-Keimlingen wurde mit einem Pulsamplituden-Modulations-Fluorometer (PAM 101/103; Walz, Effeltrich) gemessen (Schreiber, 1986; Schreiber et al., 1986; Krause und Weis, 1991). Die Nomenklatur der Fluoreszenzparameter wurde von van Kooten und Snel (van Kooten und Snel, 1990) übernommen. Für die Messung wurden die Keimlinge in den Petrischalen belassen und für 5 Minuten vorverdunkelt. Die Grundfluoreszenz F_0 wurde durch das Einschalten des gepulsten Messlichtes (Pulsfrequenz: 1,6 kHz, Peakwellenlänge: 650 nm, Photonenflussdichte (PFD): $0,05 - 1 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, Pulsdauer: 1 µs) bestimmt. Durch einen sättigenden Weißlichtpuls (PFD: $6000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, Dauer: 1 Sekunde) konnte die maximale Fluoreszenz F_m gemessen werden. Die Auslösung des Lichtpulses geschah unter automatischer Erhöhung der Taktfrequenz des Messlichtes auf 100 kHz. Mit Hilfe dieser Messwerte wurde die variable Fluoreszenz $F_v = F_m - F_0$ und das Verhältnis F_v/F_m berechnet. Eine Minute nach dem Lichtpuls wurde aktinisches Licht zugeschaltet (PFD: 200

$\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, Weißlicht), um die Photosynthese anzuregen. Die Einstellung eines Fließgleichgewichtes F_s wurde 5 Minuten verfolgt. Durch das Auslösen eines zweiten sättigenden Weißlichtpulses wurde die maximale Fluoreszenz von lichtadaptierten Blättern (F_m') gemessen. Nach Ausschalten des aktinischen Lichtes wurde die Grundfluoreszenz lichtadaptierter Blätter (F_o') bestimmt. Mit Hilfe dieser Werte konnten die photochemische Fluoreszenzlöschung [$q_p = (F_m' - F_s)/(F_m' - F_o')$] und die Quantenausbeute des Photosystem II [$\Phi_{II} = (F_m' - F_s)/F_m'$] errechnet werden (Schreiber, 1986; Genty et al., 1989).

7.2 Messung der P700-Redoxkinetik an Blättern von *Arabidopsis thaliana*

Redoxreaktionen im Photosystem I können anhand von Absorptionsänderungen des P700 im nahen Infrarotbereich verfolgt werden. Dazu wurde ein PAM-Fluorometer (PAM 101, Walz, Effeltrich) mit einer Emittor-Detektor-Einheit P700 DW (Walz, Effeltrich) kombiniert. Über die Zwei-Wellenlängen-Emittor-Detektor-Einheit wurde die differentielle Absorptionsänderung (810 nm minus 860 nm) bestimmt (Schreiber et al., 1988; Klughammer und Schreiber, 1998). Die intakten Blätter mindestens 3 Wochen alter *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen wurden vorverdunkelt und im Anschluss mit aktinischem Licht bestrahlt (PFD: $150 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Nach Abschalten des aktinischen Lichtes wurde die Absorptionsänderung ΔA bei Messlicht mit der Taktfrequenz 100 kHz und maximal abgleichbarer Lichtintensität der PAM 101 Kontrolleinheit verfolgt. Durch Zuschalten von Fernrotlicht (Wellenlänge: 720 nm, PFD: $15 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) nach einer Minute über die Fotodiode 102 FR (Walz, Effeltrich) wurde die Oxidation des Photosystems verfolgt und die maximale Absorptionsänderung ΔA_{max} bestimmt. Nach zwei Minuten wurde ein sättigender Weißlichtpuls appliziert (PFD: $6000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, Dauer: 200 ms).

8. Computergestützte Sequenzanalysen

Sequenzanalysen auf Protein- und Nukleinsäureebene wurden mit den Programmen MacMolly Tetra, SoftGene GmbH, Bocholt (Schöneberg et al., 1994) und ClustalX (Thompson et al., 1997) durchgeführt. Mit Hilfe des BLAST-Servers (Basic Local Alignment Search Tool; Altschul et al., 1994) und der Conserved Domain Database (CDD) des National Center for Biotechnology Information (Bethesda, USA) wurden Datenbanken nach ähnlichen Protein- und Nukleinsäuresequenzen und Proteinen mit ähnlichen Strukturen durchsucht. Des weiteren wurden die Web-Werkzeuge SMART (Simple Modular Architecture Research Tool; Letunic et al., 2004), Pfam (Bateman et al., 2004), Jnet (Cuff und Barton, 2000), ChloroP (Emanuelsson et al., 1999) und WoLF PSORT (Horton, Manuskript in Vorbereitung) genutzt, um mögliche Rückschlüsse auf die Struktur, die Lokalisation und die mögliche Funktion der untersuchten Proteine zu ziehen.

9. Allgemeine molekularbiologische Methoden

Grundsätzliche Methoden, wie die Aufreinigung von Nukleinsäuren über Phenol-/Chloroform-Extraktion und Präzipitation, sowie ihre Auftrennung in Agarosegelen mittels Elektrophorese

und nachfolgende Anfärbung mit Hilfe von Ethidiumbromid erfolgten nach Standardprotokollen (Sambrook et al., 1989).

Die Elution von Nukleinsäurefragmenten wurde mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) durchgeführt.

Restriktionen, Dephosphorylierungen und Ligationen wurden nach Vorschrift der jeweiligen Enzymhersteller ausgeführt.

10. DNA-Analysen

10.1 Isolierung von DNA aus Einzelpflanzen

Die Isolierung von DNA aus Einzelpflanzen wurde gemäß der Vorschrift von Edwards, Johnstone und Thompson (Edwards et al., 1991) durchgeführt. Dazu wurden einzelne Blätter in 1,5 ml Reaktionsgefäße geerntet, in flüssigem Stickstoff eingefroren und mit Hilfe eines Mikropistills zerkleinert. Das Pulver wurde in 400 µl Extraktionspuffer (0,2 M Tris/HCl, pH 7,5; 0,25 M NaCl; 25 mM EDTA; 0,5 % (w/v) SDS) aufgenommen und für 5 Sekunden auf einem Vortex-Gerät gemixt. Um unlösliche Bestandteile zu entfernen, wurden die Homogenate für 3 Minuten bei maximaler Umdrehungszahl und Raumtemperatur in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Zur Fällung der DNA wurden 300 µl des Überstandes zu 300 µl Isopropanol gegeben und für 2 Minuten inkubiert. Die Sedimentation der Nukleinsäuren erfolgte für 5 Minuten bei maximaler Umdrehungszahl in einer Tischzentrifuge. Nach der Trocknung wurde das DNA-Pellet in 50 – 100 µl sterilem Wasser oder 10 mM Tris/HCl, pH 8,0 gelöst. Für nachfolgende PCR-Analysen wurden 1-3 µl der erhaltenen DNA-Lösung eingesetzt.

Für die Isolierung von DNA von höherer Qualität und Sauberkeit wurde das DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden) verwendet.

10.2 DNA-Amplifizierung durch die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (Saiki et al., 1988) wurden DNA-Fragmente von nukleärer und plastidärer DNA von *Arabidopsis thaliana*, von Plasmid-DNA und einzelsträngiger cDNA amplifiziert. Eine Aufstellung der hierfür verwendeten Oligonukleotide ist im Anhang zu finden. Zu Klonierungszwecken wurden die Oligonukleotide mit geeigneten Restriktionsstellen in den 5'-überhängenden Bereichen ausgestattet. Die Amplifizierung der Fragmente in Standardreaktionen, wie den Kartierungs- und Kolonie-PCRs, erfolgte mit Hilfe einer Taq-Polymerase, die in unserem Labor von Oliver Bläsing und Udo Gowik hergestellt wurde. Für die Amplifizierung von DNA-Abschnitten zur späteren Sequenzierung oder Klonierung und die Vervielfältigung von einzelsträngiger cDNA wurden die Pfu-Polymerase (Stratagene, Heidelberg) oder der Advantage cDNA Polymerase Mix (Clontech, Palo Alto, USA) eingesetzt.

Standard-PCR-Ansätze mit einem Volumen von 20 µl enthielten für die jeweilige Polymerase spezifischen Reaktionspuffer, Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs; jeweils 200 µM), Oligonukleotide (1 µM) und Polymerase (1 U).

Als Matrize wurden etwa 50 – 200 ng genomische DNA bzw. 2-25 ng Plasmid-DNA eingesetzt. Für die Kartierungs-PCR wurden 1 - 3 µl der DNA-Lösungen, die aus einzelnen Pflanzen isoliert wurden, verwendet, zur Synthese von doppelsträngiger cDNA (Reaktionsvolumen 50 µl) 5 µl des Erststrangansatzes (II.11.2). Für Kolonie-PCR-Reaktionen wurden Bakterienkolonien mit einer Pipettenspitze angestochen und in dem PCR-Prämix abgespült.

Die Matrizen-DNA wurde zu Beginn jeder PCR für 4 Minuten bei 95 °C denaturiert und zu Beginn jedes neuen Zyklus für 15 - 30 Sekunden. Die Anlagerungstemperatur der Oligonukleotide richtete sich nach ihren T_m -Werten und wurde im Allgemeinen zwischen 50 – 65 °C gewählt. Alternativ kam die Methode der Touch-down-PCR zum Einsatz. Hierbei wurde die Anlagerungstemperatur in den ersten 10 Zyklen schrittweise um 1 °C erniedrigt. Die Dauer der Primeranlagerung betrug 15 – 30 Sekunden. Die Primerextension fand je nach verwendeter Polymerase bei 68 °C bzw. 72 °C statt. Die Syntheszeit richtete sich ebenfalls nach dem verwendeten Enzym, da sich die Syntheseraten der einzelnen Polymerasen deutlich unterscheiden, und der Länge des zu amplifizierenden Fragmentes. Im Allgemeinen wurden die DNA-Fragmente in insgesamt 30 – 35 Zyklen vervielfältigt. Für die Amplifizierungsreaktionen standen PCR-Geräte der Typen PE GeneAmp PCR System 9700 und 2700 (Perkin Elmer Applied Biosystems, Langen) zur Verfügung.

10.3 Kartierung des *HCF173*-Locus

Da die Mutante *hcf173* durch EMS-Mutagenese erzeugt wurde, wird der *hcf*-Phänotyp durch eine Punktmutation hervorgerufen. Der Locus der Mutation kann somit nur über die markergestützte Positionsklonierung identifiziert werden. Bisher wurde das Gen *HCF173* durch eine Grobkartierung (durchgeführt von Dr. K. Meierhoff und S. Paradies) mit Hilfe der Kombination einzelner molekularer Marker zweier Markersets (Konieczny und Ausubel, 1993; Bell und Ecker, 1994) und 159 homozygot mutanten Keimlingen auf dem oberen Arm von Chromosom 1 lokalisiert. Die mutanten Keimlinge entstammten der F₂-Generation der oben beschriebenen Kartierungspopulation. Durch weitere Charakterisierung von 428 Familien der F₃-Generation, die jeweils ein F₂-Individuum der Kartierungspopulation repräsentieren, konnte der *HCF173*-Locus auf einen Bereich zwischen den molekularen Markern SNP634 und SNP397 (= m59) lokalisiert werden (Abb. 4).

Zusätzlich zu der DNA der F₃-Pflanzen wurde für die weitere Feinkartierung des *HCF173*-Gens DNA aus 903 F₂-Pflanzen der Kartierungspopulation isoliert. Die Pflanzen wurden im Gewächshaus kultiviert und zur Samenreife gebracht, um mit Hilfe einer Segregationsanalyse der F₃-Generation den Genotyp der F₂-Individuen am HCF-Locus zu bestimmen.

Um eine weitere Kartierung zu ermöglichen, wurden zusätzliche CAPS- und SSLP-Marker kreiert. Dazu wurden Sequenz- und Längenunterschiede einzelner DNA-Abschnitte zwischen den *Arabidopsis thaliana* Ökotypen *Columbia* und *Landsberg erecta* ausgenutzt. Die Informationen hierüber wurden von der Monsanto Arabidopsis Polymorphism and Ler Sequence Collection bezogen. Einen Überblick über die bisher verwendeten und neu kreierten molekularen Marker bietet Tabelle 4. Zur Bestimmung des Genotyps der F₂-Pflanzen am Markerlocus wurden die entsprechenden DNA-Fragmente über PCR

vervielfältigt. Im Falle der SSLP-Marker konnten die Amplifikate direkt im Anschluss gelelektrophoretisch getrennt werden. Die DNA-Fragmente der CAPS-Marker wurden zunächst mit dem entsprechenden Enzym geschnitten, um den Polymorphismus sichtbar zu machen.

Tab. 4: Übersicht über Marker, die zur Feinkartierung des *HCF173*-Locus verwendet wurden

Bezeichnung des Markers	BAC-Klon	Primerpaar	Marker-typ	Art des Polymorphismus	Fragmentgröße(n) Col [bp]	Fragmentgröße(n) Ler [bp]
T15D22-11/12	T15D22	T15D22-11/-12	SSLP	500 bp Insertion in Ler	≈ 1400	≈ 1900
SNP631	T16N11	SNP631-1/-3	SSLP	35 bp Deletion in Ler	238	203
SNP634	T16N11	SNP634-2/-3	SSLP	35 bp Insertion in Ler	112	147
SNP062/072	F7H2	SNP062/072-1/-3	CAPS	DraI-Schnittstelle in Col	171, 297	468
SNP333	T24D18	SNP333-1/-2	CAPS	MseI-Schnittstelle in Ler	224	108, 116
SNP612	T24D18	SNP612-1/-2	SSLP	11 bp Deletion in Ler	79	68
SNP039	F3O9	SNP039-1/-2	CAPS	MaeIII-Schnittstelle in Ler	183	63, 120
SNP156	F3O9	SNP156-1/-3	SSLP	33 bp Deletion in Ler	221	188
SNP711/918	F19K19	SNP711/918-H1/-R1	CAPS	SspI-Schnittstelle in Ler	380	124, 256
SNP646	F19K19	SNP646-1/-2	CAPS	AluI-Schnittstelle in Col	72, 173	245
SNP623	F17F16	SNP623-2/-3	CAPS	MunI-Schnittstelle in Col	84, 250	334
SNP872	F17F16	SNP872-H2/-R1	CAPS	RsaI-Schnittstelle in Col	56, 245	301
SNP783	F17F16	SNP783-2/-3	CAPS	MseI-Schnittstelle in Col	110, 190	300
SNP397	F20D23	SNP397-1/-2	CAPS	MaeII-Schnittstelle in Ler	≈ 1000	≈ 500, ≈ 500
SNP365	F6A14	SNP365-1/-2	SSLP	47 bp Deletion in Ler	310	263
SNP340	F6F9	SNP340-1/-2	CAPS	AsnI-Schnittstelle in Ler	31, 254, 482	31, 43, 254, 439

10.4 Klonierung der *HCF173*cDNA und *HCF173*-Fusionsgene

Um den Phänotyp der Mutante *hcf173* zu komplementieren, wurde die *HCF173*cDNA kloniert. Zusätzlich wurden mehrere Fusionsgene, bestehend aus *HCF173* und verschiedenen Tags, hergestellt, um Lokalisations- und Interaktionsstudien bezüglich des *HCF173*-Proteins zu ermöglichen. In einem ersten Schritt wurde die cDNA von *HCF173* (s.II.11.2) in den Vektor pCR2.1-TOPO (Invitrogen, Karlsruhe) kloniert. Dieser Vektor besitzt 3'-überhängende Thymidinreste, die eine direkte Klonierung von PCR-Produkten ermöglichen, die über 3'-überhängende Adenosinreste verfügen. Solche PCR-Produkte können z. B. bei der Verwendung von Taq-Polymerase als amplifizierendem Enzym entstehen (Hu, 1993). Durch Restriktion mit den Enzymen EcoRV und BamHI wurde die *HCF173*cDNA aus dem TOPO-Vektor entfernt und in den mit SmaI/BamHI geschnittenen binären Ti-Vektor pPEX001 (Dr. B. Reiss, MPIZ Köln) umklontiert (pPEXAtHCF173-1).

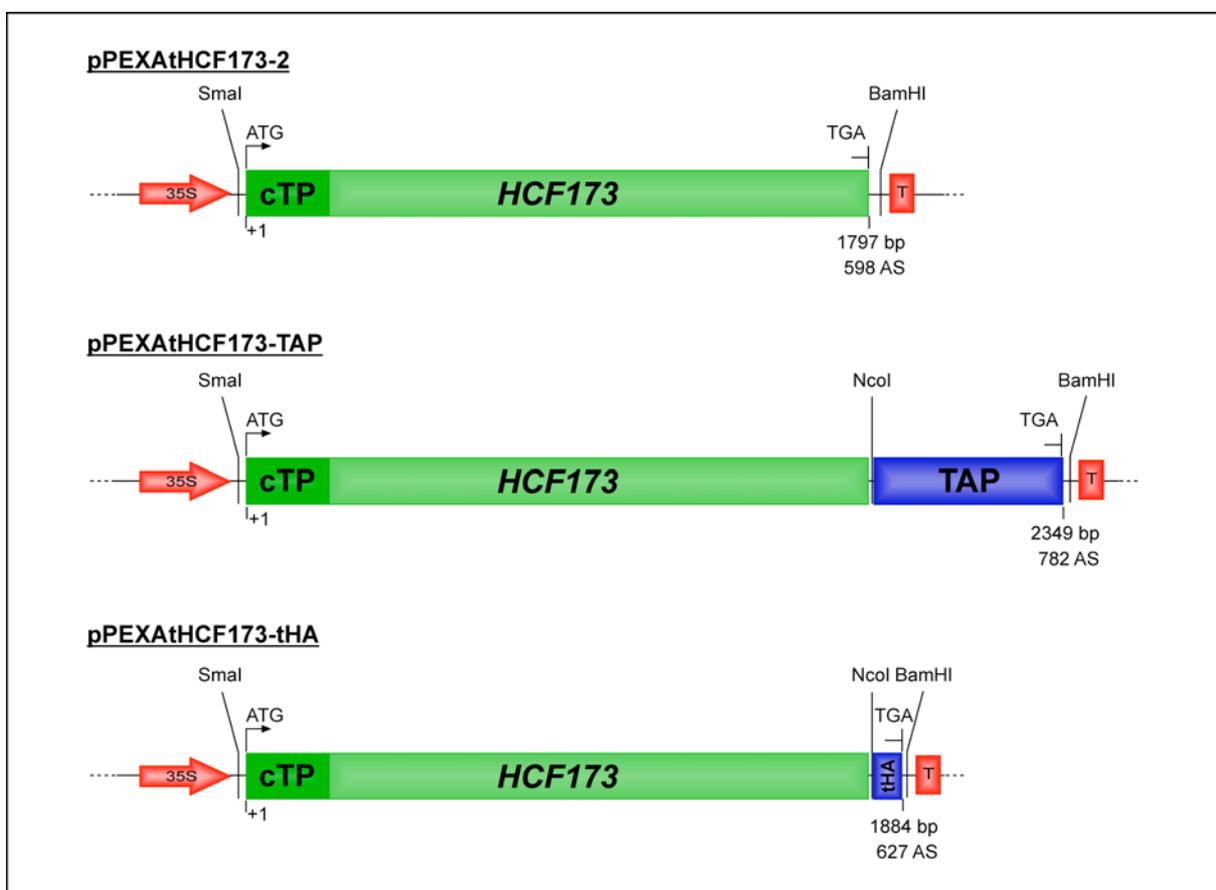


Abb. 5: Fusionsgene zur Komplementation der Mutante *hcf173-1*. Die Expressionskassetten der zur Transformation eingesetzten Plasmide sind schematisch dargestellt. Die cDNA des Gens *HCF173* (grün) wurde von Start- bis Stop-Codon zwischen den 35S-Promotor und den Terminator des Cauliflower Mosaic Virus (rot) kloniert (pPEXAtHCF173-2). Zur Komplementation mit etikettiertem *HCF173* wurden die Nucleinsäuresequenzen des Tandem Affinity Purification-Tags bzw. eines Triple-Hämagglutinin-Tags (blau) mit der *HCF173*-cDNA fusioniert (pPEXAtHCF173-TAP und pPEXAtHCF173-tHA). Die zur Klonierung verwendeten Restriktionsenzyme sind angegeben; cTP: DNA-Sequenzabschnitt von *HCF173*, der das plastidäre Transitpeptid codiert.

Ausgehend von diesem Plasmid wurde die cDNA, beginnend mit dem Start-Codon, ein zweites Mal mit den Primern TAP16720Smal-H und 16720-3' vervielfältigt und über die enthaltenen Smal- bzw. BamHI-Schnittstellen in den pPEX001-Vektor kloniert (pPEXAtHCF173-2) (Abb. 5).

Zur Herstellung des Fusionsgens AtHCF173-TAP wurde zum einen das *HCF173*-DNA-Fragment mit pPEXAtHCF173-1 als Matrize und den Primern TAP16720Smal-H und 16720-3xHA-R über PCR amplifiziert. Zum anderen wurde das DNA-Fragment, das das TAP-Protein etikettiert, durch Restriktion des Plasmids pBS1479 mit NcoI und BamHI isoliert. Die beiden Fragmente wurden über die NcoI-Schnittstellen fusioniert und im Anschluss über die Smal- und BamHI-Schnittstellen in den Vektor pPEX001 ligiert (pPEXAtHCF173-TAP) (Abb. 5).

Für die Herstellung des Fusionsgens AtHCF173-tHA wurde das *HCF173*-Fragment wie für AtHCF173-TAP beschrieben vervielfältigt, mit Smal geschnitten und über die glatten Enden in mit Smal restringierten pBluescript-Vektor kloniert (pBS16720Smal). Das Triple-HA-Fragment wurde über PCR mit Hilfe der Primer 3xHANcoI-H und 3xHABamHI-R und dem Plasmid Spa1g3xHA-pBS als Template isoliert. Das DNA-Fragment wurde über die NcoI- und BamHI-Schnittstellen in pBS16720Smal kloniert. Das komplette Fusionsgen wurde im Anschluss über die Smal-/BamHI-Schnittstellen an den Enden des Konstruktes in den Pflanzentransformationsvektor pPEX001 ligiert (pPEXAtHCF173-tHA) (Abb. 5).

Die Intaktheit der Konstrukte wurde durch Kolonie-PCR, Restriktionsanalysen und Sequenzierung bestätigt.

10.5 PCR-basierte Genotypisierung von *hcf173*-Linien

Zur Genotypisierung von Einzelpflanzen hinsichtlich eines *hcf*-Genotyps wurde DNA aus Einzelpflanzen isoliert und mit Hilfe von PCR und Restriktionsexperimenten analysiert.

Zur Genotypisierung von Pflanzen hinsichtlich des *hcf*-Phänotyps aufspaltender *hcf173-1* Linien wurde von der Punktmutation, die durch die ursprüngliche EMS-Mutagenese verursacht wurde, Gebrauch gemacht. Der Austausch eines Cytosins gegen Thymin führte zur Einführung einer zusätzlichen MaeIII-Schnittstelle im mutanten Allel. Zum Nachweis eines mutanten *hcf173*-Allels wurden die Primer 16720-H6 und 16720-R4 in der PCR eingesetzt und die amplifizierten DNA-Fragmente (Länge: 709 bp) für mindestens 2 Stunden bei 55°C mit MaeIII geschnitten. Im Falle des Wildtyp-Allels entstanden Fragmente von 528 bp und 181 bp Länge, im Fall des *hcf173-1* Allels betragen die Längen der Fragmente 447 bp, 181 bp und 81 bp. Zur Genotypisierung wurden nur die großen Fragmente (528 bp bzw. 447 bp) herangezogen (Abb. 6A).

Die Genotypisierung der Linie 246C02 (*hcf173-2*) erfolgte mit Hilfe der T-DNA, die in Exon 3 des Gens At1g16720 inseriert wurde. Mit Hilfe der Primerpaare 16720-H4 und 16720-R10 bzw. pPC161LB und 16720-R10 wurde in zwei getrennten Polymerase-Ketten-Reaktionen mit unterschiedlichen Extensionszeiten das Wildtyp-Allel (Länge des PCR-Fragmentes: 796 bp) bzw. das Mutanten-/T-DNA-Allel (Länge des PCR-Fragmentes: 328 bp) nachgewiesen (Abb. 6B).

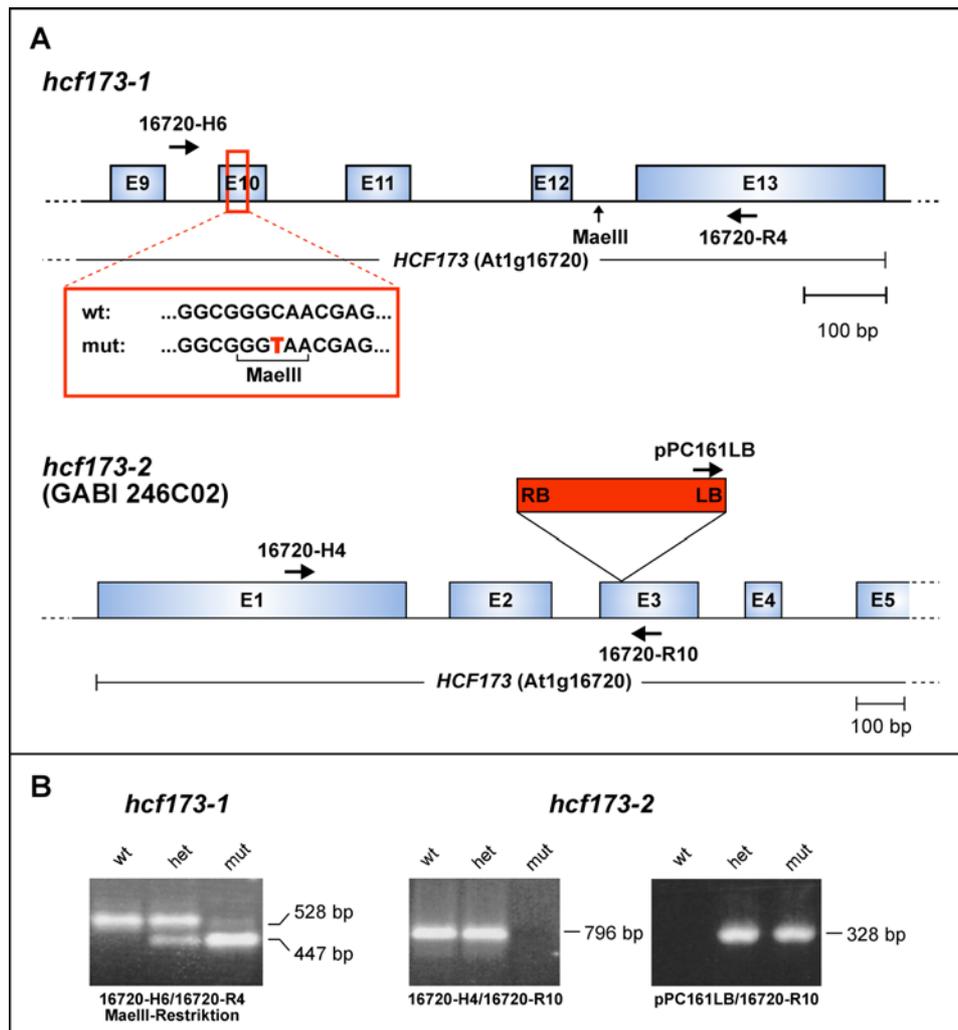


Abb. 6: Identifizierung der Mutanten *hcf173-1* und *hcf173-2* mit Hilfe von PCR. (A) Schematische Darstellung genomischer Abschnitte von *HCF173*, die für die auf PCR basierende Identifizierung der Mutantenallele relevant sind. Die Lage der Punktmutation (*hcf173-1*) bzw. T-DNA-Insertion (*hcf173-2*) sind rot gekennzeichnet. Verwendete Oligonukleotide (schwarze Pfeile) sind angegeben. E: Exon; LB: left border; RB: right border (B) Beispiel-Genotypisierung der Mutanten *hcf173-1* und *hcf173-2*. wt: Wildtyp, het: heterozygote Pflanze, mut: homozygote Mutante

10.6 Nachweis der *HCF173*-Fusionsgene

Nach der Transformation heterozygoter Mutanten (T_0 -Generation) mit der cDNA (pPEXAtHCF173-2) und den Fusionsgenen pPEXAtHCF173-TAP und pPEXAtHCF173-tHA wurde die Nachkommenschaft (T_1) auf Resistenz gegenüber dem Herbizid Basta getestet. Um die Stringenz des Testes zu überprüfen, wurde DNA aus den resistenten Pflanzen isoliert und über PCR-Analyse die Anwesenheit der T-DNA kontrolliert. Bei transformierten Pflanzen sollte mit den Oligonukleotiden PEX-H (35S-Promotor) und 16720-R6 (cDNA) ein PCR-Produkt von 668 bp amplifiziert werden.

11. RNA-Analysen

11.1 Isolierung von Gesamt- und Poly (A⁺)-RNA

Die Isolierung von Gesamt-RNA wurde nach der Methode von Westhoff et al. (1991) durchgeführt. Dazu wurden drei bis vier Wochen alte, steril kultivierte *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen unter flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver zermörsert. Das Zellpulver wurde in auf 50°C vorgewärmten Isolierungspuffer (330 mM Sorbit, 200 mM Tris, 300 mM NaCl, 10 mM EGTA, 10 mM EDTA, 2 % (w/v) SDS; pH 9,0) aufgenommen und gerührt, bis keine Klumpen mehr erkennbar waren. Zu dieser Suspension wurde ein Volumen Chloroform gegeben und für weitere 20 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Zur Phasentrennung wurde das Gemisch für 10 Minuten im SS34-Rotor bei 7000 UpM zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde ein zweites Mal mit einem Gemisch aus einem Volumen puffergesättigtem Phenol (0,1M Tris/HCl, pH 8,0; 0,2 % (v/v) β -Mercaptoethanol; 0,1% (w/v) 8-Hydroxychinolin) und einem Volumen Chloroform und ein drittes Mal mit einem Volumen Chloroform extrahiert. Durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 6,0) und einem Volumen Isopropanol wurden die Nukleinsäuren bei -20°C über Nacht gefällt. Durch zehnmünütige Zentrifugation bei 9000 UpM und 4°C im HB4-Ausschwingrotor wurden die Nukleinsäuren sedimentiert und im Anschluss in Borat-Puffer (80 mM Tris/Borat, pH 8,0; 10 mM EDTA) gelöst. Durch Zugabe von 1/3 Volumen 8 M LiCl konnte selektiv die hochmolekulare RNA über Nacht bei 4°C gefällt und im Anschluss durch eine erneute Zentrifugation sedimentiert werden. Die pelletierte RNA wurde 1 – 2 mal mit eiskaltem 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und in sterilem Wasser rückgelöst.

Kleine Mengen RNA aus bis zu 300 mg Pflanzenmaterial wurden mit dem RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden) isoliert. Die verwendeten Mengen des Puffers RLT und des Ethanols wurden dem Gewicht des Ausgangsmaterials angepasst. Nach der Bindung der RNA an das Säulenmaterial wurde laut Herstellerangaben weiterverfahren. Zur Entfernung möglicher DNA-Kontaminationen wurde bei Bedarf im Anschluss eine Behandlung mit DNase I (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) durchgeführt.

Poly (A⁺)-RNA wurde mit Hilfe von Oligotex (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben isoliert.

11.2 Reverse Transkription/cDNA-Herstellung

Zur Herstellung der *HCF173*cDNA wurde das SMART RACE cDNA Amplification Kit (Clontech, Palo Alto, USA) verwendet und im Prinzip nach Herstellerangaben vorgegangen. Es wurden je 130 ng wildtypische Poly (A⁺)-RNA zur Erststrangsynthese des 5'- und des 3'-Fragments eingesetzt. Die Erststränge (5 μ l) wurden in insgesamt 50 μ l Reaktionsvolumen mit je 2,4 μ M Universal Primer Mix und 1 μ M genspezifischen Primern (16720-H5 bzw. 16720-R1) über PCR mit Advantage 2 Polymerase (Clontech, Palo Alto, USA) vervielfältigt. Die vollständige *HCF173*cDNA wurde durch Ligation über eine KpnI-Schnittstelle in *HCF173* erhalten. Das Leseraster (ORF) von *HCF173* ist dem Anhang zu entnehmen.

Für allgemeine Reverse Transkriptions-PCR wurden zur Erststrangsynthese Oligo-dT-Primer und SuperScript II- (Invitrogen, Karlsruhe) bzw. RevertAid M-MuLV Reverse Transkriptase

(MBI Fermentas, St. Leon-Rot) eingesetzt. Für die Amplifizierung des Erststranges oder Fragmente von diesem wurden im Allgemeinen genspezifische Oligonukleotide verwendet. Es wurde nach Herstellerangaben verfahren.

11.3 Northern-Analysen

Gesamt-RNA oder Poly (A⁺)-RNA wurde für die denaturierende Gelelektrophorese mit etwa 1 M Glyoxal nach der Methode von McMaster und Carmichael (McMaster und Carmichael, 1977) glyoxyliert und mit 1/4 Volumen RNA-Probenpuffer (90 % deionisiertes Formamid; 10 mM EDTA, pH 7,5; 0,01 % (w/v) Bromphenolblau; 0,01 % (w/v) Xylencyanol) versetzt. Alternativ wurde die Glyoxal Sample Loading Dye-Lösung von Ambion (Austin, Texas, USA) eingesetzt.

Die so behandelten Proben wurden auf ein 1,2 %iges Agarosegel aufgetragen, dessen Probentaschen mit Elektrophoresepuffer (20 mM MOPS, 5 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA; pH 7,0) gefüllt waren. Die Elektrophorese wurde zur besseren Wärmeabführung bei konstanten 120 V in der Kalkammer bei 4°C durchgeführt, bis das Bromphenolblau etwa zwei Drittel der Trennstrecke durchlaufen hatte. Als Größenstandard wurde 1 µg PstI-geschnittene und glyoxylierte λ-DNA eingesetzt. Alternativ wurde die 0,24 - 9,5 kb RNA-Leiter von Invitrogen (Karlsruhe) verwendet. Diese erlaubte später eine Sichtbarmachung des Größenstandards ohne radioaktive Markierung über Färbung mit Methylenblau.

Im Anschluss an die Elektrophorese wurde die RNA über Saugströmung auf eine Hybond N Nylonmembran (Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden) übertragen. Als Blotting-Puffer wurde 20 x SSC (3 M NaCl, 0,33 M Natriumcitrat; pH 7,0) eingesetzt. Die übertragene RNA wurde im UV-Crosslinker durch eine Bestrahlung von 30000 µJ/cm² auf der Membran fixiert.

Zum Nachweis spezifischer RNAs wurden radioaktiv markierte DNA-Sonden eingesetzt. Die Markierung erfolgte mit dem Mega Prime Labeling Kit der Firma GE Healthcare (Uppsala, Schweden). Zur Markierung wurden ca. 20 ng Sonde mit 15 µCi [α -³²P]dATP (Aktivität 3000 Ci/mmol) in einem Gesamtreaktionsvolumen von 15 µl verwendet. Die Einbaurate des radioaktiven Nukleotids wurde mit Hilfe eines Flüssigkeitsszintillationszählers (LS5000CE, Beckman) bestimmt. Die DNA-Fragmente, die als Sonden dienten, wurden durch Restriktion verschiedener Plasmide und PCR (s. Tab. 2 u. 3) gewonnen. Zum Nachweis des λ-DNA-Längenstandards wurde λ-DNA radioaktiv markiert.

Die RNA-Filter wurden im Hybridisierungsöfen mindestens eine Stunde bei 64°C in Hybridisierungspuffer (250 mM Na₂HPO₄, pH 7,2; 7 % (w/v) SDS; 2,5 mM EDTA) vorhybridisiert. Im Anschluss wurde die radioaktiv markierte Sonde in wenigen ml frischem Hybridisierungspuffer zum Filter gegeben. Die Hybridisierung wurde 14 – 18 Stunden über Nacht bei 64°C durchgeführt. Die Filter wurden je 2 x 15 Minuten bei 64°C mit 2 x SSC/1 % (w/v) SDS, 1 x SSC/1 % (w/v) SDS, 0,5 x SSC/1 % (w/v) SDS und 0,1 x SSC/1 % (w/v) SDS gewaschen und in Haushaltsfolie eingeschlagen. Die radioaktiven Signale wurden durch Exposition der Filter auf einem Röntgenfilm (Kodak X-Omat AR5 oder CEA Wicor-X RP) mit Hilfe einer Verstärkerfolie (Cronex Quanta III, Du Pont, USA) bei -70°C und anschließender Entwicklung der Filme in der Dunkelkammer sichtbar gemacht. Alternativ wurden die Filter

auf BAS-MS-Screens (Fujifilm, Kanagawa, Japan) exponiert und anschließend im Bio-Imaging Analyzer (BAS-1800, Fujifilm) ausgelesen.

Sollten die Filter ein weiteres Mal Verwendung finden, so wurden die Sonden unter Schütteln durch zweimaliges dreißigminütiges Waschen der Filter bei 95°C mit 0,05 x SSC/0,5 % (w/v) SDS entfernt.

11.4 Bestimmung von *HCF173*-Transkriptmengen in etiolierten und belichteten Keimlingen von *Arabidopsis thaliana* über Real-Time-PCR

Arabidopsis thaliana Wildtyp Saatgut wurde auf 1/2 MS-Medium ohne Zucker ausgelegt und lichtdicht für 3 Tage bei 4°C zur Synchronisation der Keimung gelagert. Um die Keimung zu induzieren, wurden die Petrischalen mit dem Saatgut für 1 h in den beleuchteten Kulturschrank gestellt. Im Anschluss wurden die Schalen wieder lichtdicht verpackt und für 5 Tage im Kulturschrank bei 23°C etioliert. Bevor die etiolierten Keimlinge zur Einleitung der Ergrünung für maximal 24 h in kontinuierliches Licht überführt wurden, wurde ein kleiner Teil unter Grünlicht geerntet (0 h/Dunkel-Probe). Die belichteten Keimlinge wurden nach 1, 2, 4, 8 und 24 h im Licht geerntet. Die Keimlinge wurden in 200 – 300 mg Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren. RNA wurde mit Hilfe des RNeasy Plant Mini Kit von Qiagen (Hilden) isoliert. Eventuelle DNA-Kontaminationen wurden mit DNaseI beseitigt. Die RNA wurde erneut über ein Säulchen aus dem RNeasy Plant Mini Kit aufgereinigt. Die RNA-Konzentration wurde durch Absorptionsmessungen im Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt und auf 250 ng/µl eingestellt. Die RNA-Konzentrationen wurden anhand der ribosomalen RNA-Banden auf einem Agarosegel überprüft.

Zur Bestimmung der *HCF173*-Transkriptpegel in den einzelnen Proben mit Hilfe der Real-Time-PCR wurden je 1 µg RNA in einem Gesamtreaktionsvolumen von jeweils 20 µl mit 1 µl (200 U) RevertAid M-MuLV Reverse Transkriptase und 35 µM Endkonzentration Oligo-dT-Primer nach Herstellerangaben in einzelsträngige cDNA überführt. Jeweils 1 µl der Erststrangproben wurde mit 12,5 µl SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, USA) und je 0,6 µM genspezifischer Primer (At1g16720RT-H und At1g16720RT-R) versetzt. Der benötigte Reaktionspuffer und die Polymerase (AmpliAq Gold-Polymerase) waren bereits im SYBR-Green-Mix enthalten. Für jeden Zeitpunkt wurden drei gleiche Ansätze pipettiert und in der Real-Time-PCR (GeneAmp 5700, Perkin Elmer Applied Biosystems, Langen) vervielfältigt. Um Pipettierfehler zu vermeiden, wurden Prämixe mit den einzelnen Komponenten angefertigt. Als Negativ-Kontrollen dienten jeweils drei Ansätze ohne Template (NTC = No Template Control) bzw. ohne Primer (NAC = No Amplification Control). Um die *HCF173*-Transkriptmengen zu den einzelnen Zeitpunkten zu bestimmen, wurden diese mit den Transkriptpegeln des Haushaltsgens Actin verglichen. Von diesem wurde angenommen, dass sein Transkriptspiegel zu jedem Zeitpunkt konstant war. Zu diesem Zweck wurden die einzelsträngigen cDNAs der verschiedenen Zeitpunkte ebenfalls in je 3 PCR-Ansätzen mit actinspezifischen Primern (Actin-H/-R) amplifiziert. Folgendes Temperaturprofil wurde für die Real-Time-PCR angewendet: 50°C 2 Minuten; 95°C 10 Minuten; (95°C 15 Sekunden, 60°C 1 Minute) x 40. Die zehnminütige Inkubationszeit zu Beginn der PCR benötigte die AmpliAqPolymerase zur Aktivierung. Der Anstieg der PCR-

Produkte wurde über Fluoreszenzmessung in jedem einzelnen Reaktionsgefäß während der PCR verfolgt.

12. Proteinanalysen und biochemische Methoden

12.1 Bestimmung der Chlorophyllkonzentration

Für die Chlorophyllbestimmung wurden 2,5 bis 5 µl Chloroplasten- bzw. Membransuspension in 1 ml 80 % (v/v) Aceton resuspendiert und bei maximaler Umdrehungszahl und Raumtemperatur für 5 Minuten in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde zur Messung der Absorption von Licht mit den Wellenlängen 645 und 663 nm eingesetzt. Die Berechnung erfolgte nach den Formeln von Chory et al. (1991) mit den spezifischen Absorptionskoeffizienten von MacKinney (MacKinney, 1941):

$$\begin{aligned}[\text{chl a}] &= 12,7 \times A_{663} - 2,69 \times A_{645} \\[\text{chl b}] &= 22,9 \times A_{645} - 4,48 \times A_{663} \\[\text{chl total}] &= [\text{chl a}] + [\text{chl b}]\end{aligned}$$

Die Chlorophyllkonzentration ist mit µg/ml anzugeben.

12.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford (Bradford, 1976) wurden Membranproteine zunächst 1:10 bis 1:20 mit 10 % (w/v) Octyl-β-D-glucopyranosid verdünnt und solubilisiert. Im Anschluss wurde ein Aliquot der Verdünnung zu 1 ml Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, München) pipettiert und nach fünf- bis zehnminütiger Inkubation bei Raumtemperatur im Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 595 nm vermessen. Um die Konzentration der Proteinproben bestimmen zu können, wurden Eichgeraden mit Hilfe verschieden konzentrierter Lösungen mit Rinderserumalbumin (BSA) als Standardprotein erstellt.

12.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Für die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen wurden diskontinuierliche Gelsysteme verwendet. Zum einen wurde mit Polyacrylamidgelen (Dicke: 0,1 cm; Trennstrecke 14 – 18 cm) im Tris-Tricin-Puffersystem nach Schagger (Schagger und von Jagow, 1987) gearbeitet. Die Trenngele enthielten je nach Verwendungszweck und Auftrennungsbereich 10 % (w/v), 12,5 % (w/v) oder 16,5 % (w/v) Polyacrylamid (49,5 %ige Stammlösung, Mix 32:1, Applichem, Darmstadt), 1M Tris/HCl (pH 8,45), 0,1 % SDS und 13,3 % (w/v) Glycerol. Bei der Auftrennung von Membranproteinen wurde alternativ zum Glycerol 6 M Harnstoff eingesetzt. Das Sammelgel setzte sich zusammen aus 4 % (w/v)

Polyacrylamid, 0,744 M Tris/HCl (pH 8,45) und 0,744 % (w/v) SDS. Der Kathodenpuffer (pH 8,25) setzte sich aus 100 mM Tris/HCl, 100 mM Tricin, 0,1 % (w/v) SDS zusammen. Der Anodenpuffer (pH 8,9) enthielt 1 M Tris/HCl. Vor der Auftrennung auf dem SDS-Polyacrylamidgel wurden die Proben zunächst durch Zugabe desselben Volumens an Blaupuffer (100 mM Na₂CO₃, 10 % (w/v) Saccharose, 50 mM DTE, 5 % (w/v) SDS, 0,02 % (w/v) Bromphenolblau) und anschließender Inkubation von 15 Minuten bei Raumtemperatur und 30 Sekunden bei 70 °C (Membranproteine) bzw. 1 Minute bei 100°C (lösliche Proteine) solubilisiert und denaturiert. Um unlösliche Bestandteile abzutrennen, wurden die Proben für 10 Minuten bei 10000 UpM in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Die Elektrophorese erfolgte zunächst für 1 Stunde bei 30 V. Nachdem die Proteine in das Sammelgel eingedrungen waren, wurde die Elektrophorese bei konstanten 80 – 120 V fortgesetzt. Der Gellauf erfolgte über Nacht für ca. 15 – 18 h bei Raumtemperatur.

Das zweite verwendete diskontinuierliche Gelsystem basierte auf der Methodik von Laemmli (Laemmli, 1970). Die Trenngele setzten sich zusammen aus 5,5 % (w/v) bzw. 10 % (w/v) Polyacrylamid (30 %ige Stammlösung, Mix 29:1, Applichem, Darmstadt), 375 mM Tris/HCl (pH 8,8) und 0,1 % (w/v) SDS. Das Sammelgel enthielt 5 % (w/v) Polyacrylamid, 125 mM Tris/HCl (pH 6,8) und 0,1 % (w/v) SDS. Der Laufpuffer (Kathoden- und Anodenpuffer; pH 8,8) bestand aus 192 mM Glycin, 25 mM Tris/HCl und 0,1 % (w/v) SDS. Die Elektrophorese und die Probenvorbereitung für die Elektrophorese wurde analog zum Schäggersystem durchgeführt, allerdings mit einem anderen Blaupuffer (292 mM Tris/HCl (pH 6,8); 25 % (v/v) Glycerin; 8,3 % (w/v) SDS; 8,3 % (v/v) β-Mercaptoethanol, 0,1 % (w/v) Bromphenolblau), von dem 1/4 Volumen zur Probe gegeben wurde.

Um Proteine aufzutrennen, deren Größen in einem breiten Spektrum bezüglich des Molekulargewichtes auffächerten, wurden mit Hilfe eines Gradientenmischers Gradientengele mit unterschiedlichen Polyacrylamidkonzentrationen gegossen.

12.4 Färbung von SDS-Gelen

12.4.1 Coomassie-Färbung

Zur Färbung von Proteingelen mit Coomassie Brilliant Blau wurden die Gele im Anschluss an die Elektrophorese für ca. 1 Stunde in der Färbelösung (0,25 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau R250, 50 % (w/v) Methanol, 7 % (w/v) Essigsäure) geschüttelt und danach in Entfärbelösung (50 % (w/v) Methanol, 7 % (w/v) Essigsäure) geschwenkt, um die Hintergrundfärbung des Gels zu entfernen.

Um eine sensitivere Färbung mit Coomassie zu erzielen, wurde nach dem Protokoll von Kang (Kang et al., 2002) gearbeitet, das auf dem Prinzip der colloidalen Coomassie-Färbung basiert. Das Proteingel wurden nach dem Gellauf 3 x 10 Minuten in destilliertem Wasser gewaschen. Im Anschluss wurden die Proteine durch 30-minütige Inkubation in 30 % (v/v) Ethanol und 2 % (w/v) Phosphorsäure fixiert. Das Gel wurde über Nacht oder mindestens zwei Stunden in Färbelösung (0,02 % Coomassie Brilliant Blau G250, 2 % (w/v) Phosphorsäure, 5 % (w/v) Aluminiumsulfat (Al₂(SO₄)₃ x (H₂O)_n, n = 14-18), 10 % (v/v) Ethanol) geschwenkt. Im Anschluss wurden die Gele im Bedarfsfall zur Erhöhung des Kontrastes zwischen Gelbanden und Hintergrund mit Wasser oder 10 % (v/v) Ethanol, 2 % (w/v) Phosphorsäure gewaschen.

12.4.2 Silberfärbung

Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden nach dem Protokoll von Shevchenko (Shevchenko et al., 1996) mit Silber angefärbt und dazu zunächst durch 20-minütige Inkubation in 50 % (v/v) Methanol und 5 % Essigsäure (v/v) im Polyacrylamidgel fixiert. Das Gel wurde anschließend für 10 Minuten in 50 % (v/v) Methanol und weitere 10 Minuten in Wasser gewaschen. Um die Färbung zu sensitivieren, wurde das Gel für 1 Minute in 0,02 % (w/v) Natriumthiosulfat inkubiert und zweimal mit Wasser gespült. Die Färbung der Proteine erfolgte unter Schwenken bei 4 °C für 20 Minuten in 0,1 % (w/v) Silbernitrat. Nach zweimaligem Spülen des Gels mit Wasser wurde die Färbung der Proteinbanden mit 0,04 % Formalin in 2 % Natriumcarbonat sichtbar gemacht. Bei Gelbfärbung des Entwicklers während des Entwicklungsvorganges wurde dieser durch frische Lösung ersetzt. Wenn die Banden die gewünschte Intensität zeigten, wurde die Entwicklung durch Abgießen des Entwicklers und durch Waschen des Gels in 5 % (v/v) Essigsäure beendet.

12.5 Elektrotransfer von Proteinen

Für immunologische Analysen wurden gelelektrophoretisch aufgetrennte Proteine mit Hilfe einer Trockenblot-Apparatur (CTI, Taunusstein) auf Nitrocellulose-Membranen (0,1 µm, BA79, Schleicher und Schuell, Dassel) übertragen. Der Transferpuffer setzte sich zusammen aus 96 mM Glycin, 10 mM Tris und 10 % (v/v) Methanol (Towbin et al., 1979). Der Transfer wurde für 2 Stunden bei einer konstanten Stromstärke von 0,35 mA/cm² durchgeführt. Die unbesetzten Protein-Bindeplätze der Nitrocellulose-Membran wurden durch einstündiges Blocken bei Raumtemperatur oder Blocken über Nacht bei 4°C abgesättigt. Als Blocking-Reagenz wurde 5 % (w/v) Magermilchpulver in TBS-T (20 mM Tris/HCl (pH 7,6), 137 mM NaCl, 0,1 % (v/v) Triton X-100) eingesetzt. Im Anschluss wurden die Membranen kurz mit TBS-T gespült.

12.6 Immunodetektion von filtergebundenen Proteinen

Für den immunologischen Nachweis der filtergebundenen Proteine erfolgte zunächst eine Inkubation mit dem Erstantikörper über Nacht bei 4 °C auf einem Über-Kopf-Schüttler. Der Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:1000-1:5000 in TBS-T eingesetzt. Im Anschluss wurde die Membran 1 x 15 Minuten und 2 x 5 Minuten mit TBS-T gewaschen. Die Inkubation mit dem Zweitantikörper erfolgte für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Dazu wurden das Anti-Rabbit-Peroxidase-Konjugat (A9169, Sigma, Saint Louis, Missouri, USA) 1:50000-1:80000 bzw. das Anti-Mouse-Peroxidase-Konjugat (A9044, Sigma, Saint Louis, Missouri, USA) 1:80000 in TBS-T verdünnt.

Für den Nachweis von Fusionsproteinen mit TAP-Tag mit Hilfe des Anti-Mouse-Peroxidase-Konjugats oder des PAP-Komplexes (löslicher Peroxidase-Anti-Peroxidase Komplex, P1291, Sigma, Saint Louis, Missouri, USA) über den Protein A-Teil des Tags war eine Inkubation mit einem Erstantikörper überflüssig. Die Inkubationsschritte mit dem PAP-Komplex wurden in PBS-T (80 mM Na₂HPO₄, 20 mM NaH₂PO₄ x 2H₂O, 100 mM NaCl, 0,1 % (v/v) Triton X-100) durchgeführt.

Zum Nachweis von Fusionsproteinen, die mit dem HA-Epitop etikettiert sind, wurde entweder ein HA-Erstantikörper (Babco, Berkeley, Kalifornien, USA) mit anschließender Verwendung des Anti-Mouse-Peroxidase-Konjugats eingesetzt oder aber direkt ein HA-Antikörper-Peroxidase-Konjugat (Roche, Indianapolis, USA).

Die Detektion der gebundenen Antikörper wurde mit dem ECL-(Enhanced Chemiluminescence) System (GE Healthcare, Uppsala, Schweden) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Menge der eingesetzten Substrate wurde jedoch reduziert.

Sollten die Filter ein zweites Mal verwendet werden, so wurden im Bedarfsfall die gebundenen Antikörper durch 2 x einstündige Inkubation der Filter in Waschpuffer (200 mM Glycin (pH 2,2), 0,1 % (w/v) SDS, 1 % (w/v) Tween-20) bei 50 °C unter Schütteln von der Membran gelöst.

12.7 Isolierung von Proteinen aus *Arabidopsis thaliana*

Drei bis vier Wochen alte steril angezogene *Arabidopsis thaliana* Pflanzen wurden unter flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver zermörsert. Das Pulver wurde unter Rühren in Homogenisationsmedium (10 mM EDTA; 2 mM EGTA; 50 mM Tris/HCl, pH 8,0; 10 mM DTE) resuspendiert und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Das Homogenat wurde über zwei Lagen Miracloth filtriert. Die Membranen wurden von den löslichen Proteinen durch eine zehnmünütige Zentrifugation bei 4°C und 10000 UpM im SS34-Festwinkelrotor getrennt. Das Sediment wurde in Probenpuffer (100 mM Na₂CO₃, 10 % (w/v) Saccharose, 50 mM DTE) resuspendiert.

12.8 *In vivo*-Markierung plastidärer Proteine und Immunopräzipitation von D1-Protein

10 - 15 Primärblätter etwa 15 Tage alter steril angezogener *Arabidopsis thaliana*-Keimlinge wurden für 30 Minuten in einer Cycloheximidlösung (200 µg/ml) inkubiert, um die cytoplasmatische Translation zu inhibieren. Nach Entfernen des Cycloheximids wurden die Blättchen für 20 Minuten in 200 µl einer ³⁵S-Methioninlösung [5µCi/µl ³⁵S-Methionin (spezifische Aktivität > 1000 Ci/mmol, GE Healthcare, Uppsala, Schweden), 100 µg/ml Cycloheximid] inkubiert, um im Chloroplasten *de novo* synthetisierte Proteine radioaktiv zu markieren. Die Blätter wurden im Anschluss zweimal mit Homogenisationspuffer (50 mM Tris/HCl, pH 7,5; 150 mM NaCl; 2 mM EDTA) gewaschen und danach in einem kleinen Volumen desselben Puffers mit einem Pistill aufgeschlossen. Die Membranen wurden durch eine zehnmünütige Zentrifugation bei 4°C und 12000 UpM in einer Tischzentrifuge pelletiert und in einem kleinem Volumen (20 – 30 µl) Homogenisationspuffer resuspendiert.

Mittels Immunopräzipitation sollte der Nachweis erbracht werden, dass in der Mutante *hcf173* die Synthese von D1-Protein im Vergleich zu wildtypischen Pflanzen erniedrigt ist. Zu diesem Zweck wurde zunächst der D1-Proteinspiegel der Probe der Mutante (200000 cpm) durch Zugabe von unmarkiertem Protein an den des Wildtyps angeglichen. Die Membranproteine wurden durch Zugabe von SDS (Endkonzentration 2 % (w/v)) und zunächst zehnmünütige Inkubation bei Raumtemperatur und anschließender Inkubation bei

70 °C für 30 Sekunden solubilisiert. Der Ansatz wurde 10-fach mit Immunopräzipitationspuffer (50 mM Tris/HCl, pH 7,5; 150 mM NaCl; 2 mM EDTA; 1 % (w/v) Tergitol) verdünnt, mit 10 µl eines D1-Antikörpers versetzt und über Nacht bei 4°C auf einem Rotor inkubiert. Nach Zugabe von 30 µl Protein A-Sepharose (GE Healthcare, Uppsala, Schweden) und weiterer Inkubation für 1 Stunde bei 4°C auf einem Rotor wurden die gebildeten Antigen-Antikörper-Komplexe an der Sepharose fixiert. Die Sepharose wurde durch Zentrifugation bei 3000 UpM für 5 Minuten in einer Tischzentrifuge pelletiert und im Anschluss viermal mit Immunopräzipitationspuffer gewaschen. Nach der letzten Waschung wurde die Sepharose in Probenpuffer (100 mM Na₂CO₃, 10 % (w/v) Saccharose, 50 mM DTE, 2 % (w/v) SDS) resuspendiert. Die Antigen-Antikörper-Protein A-Komplexe wurden durch einminütige Inkubation der Probe bei 70°C aufgelöst und die Proteine im Anschluss auf einem SDS-Gel aufgetrennt. Als Vergleich wurde eine Probe mit radioaktiv markierten Wildtypproteinen mitgeführt.

12.9 Autoradiographie von radioaktiv markierten Proteinen

Zum Nachweis von ³⁵S-radioaktiv markierten Proteinen über Autoradiographie wurde die Empfindlichkeit des Verfahrens durch vorherige Fluorographie gesteigert. Zu diesem Zweck wurden die Proteingele nach dem Gellauf unter Schwenken 3 x 10 Minuten in DMSO und im Anschluss 30 Minuten in 22,5 % PPO in DMSO inkubiert. Das Gel wurde mit Wasser gespült, danach 15 Minuten in frischem Wasser gewaschen, auf Whatman-Papier aufgezogen und getrocknet. Das so präparierte Gel wurde in einer Röntgenkassette auf einem Röntgenfilm exponiert.

12.10 Isolierung von intakten Chloroplasten aus *Arabidopsis thaliana*

Die Isolierung von intakten Chloroplasten aus *Arabidopsis thaliana* wurde bei 4 °C durchgeführt. Morgens geerntetes Blattmaterial von etwa vier bis sechs Wochen alten *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen wurde in 10 ml Homogenisationsmedium (330 mM Sorbit; 44 mM MES; 10 mM NaCl; 1 mM MgCl₂; 1 mM MnCl₂; 0,5 mM KH₂PO₄, 2 mM EDTA; 0,1 % (v/v) β-Mercaptoethanol; pH 6,1) pro Gramm Frischgewicht in einem Waring-Blender zerkleinert. Das Homogenat wurde über zwei Lagen Miracloth filtriert. Die Chloroplasten wurden durch Zentrifugation bei 4 °C im GSA-Rotor bis zum Erreichen einer Geschwindigkeit von 6000 UpM sedimentiert. Das Pellet wurde durch vorsichtiges Schwenken in einem kleinen Volumen Homogenisationsmedium resuspendiert. Zur Isolierung von intakten Chloroplasten, wurden die unbeschädigten Zellorganellen von bereits gebrochenen Chloroplasten durch eine Zentrifugation im Percoll-Gradienten getrennt. Zur Herstellung der Stufengradienten wurden pro Gradient 10 ml 85 % Percoll (85 % (v/v) Percoll; 2,55 % (w/v) PEG 6000; 0,85 % (w/v) BSA; 0,85 % (w/v) Ficoll; 330 mM Sorbitol; 50 mM Hepes/KOH (pH 7,8); 2 mM EDTA; 1 mM MgCl₂; 2 mM DTE) langsam mit 12 ml 45 % Percoll (45 % (v/v) Percoll; 1,35 % (w/v) PEG 6000; 0,45 % (w/v) BSA; 0,45 % (w/v) Ficoll; 330 mM Sorbitol; 50 mM Hepes/KOH (pH 7,8); 2 mM EDTA; 1 mM MgCl₂; 2 mM DTE) in einem Corex-Röhrchen überschichtet. Die Chloroplastensuspension wurde auf den Gradienten geschichtet und für

10 Minuten bei 8000 UpM im HB4-Ausschwingrotor (Sorvall-Zentrifuge RC B5) zentrifugiert. Die intakten Chloroplasten (untere grüne Bande) wurden mit einer abgeschnittenen blauen Pipettenspitze geerntet. Die Chloroplasten wurden zweimal mit mindestens 3 Volumen Resuspendierungsmedium versetzt und durch jeweils zweiminütige Zentrifugation ab Erreichen der Höchstgeschwindigkeit von 6000 UpM im HB4-Ausschwingrotor bei 4 °C sedimentiert. Im Anschluss wurden die Chloroplasten in einem geringen Volumen Resuspendierungsmedium aufgenommen.

12.11 Isolierung von Thylakoidmembranen aus *Arabidopsis thaliana*

Zur Isolierung von grob aufgereinigten Thylakoidmembranen wurde vier bis sechs Wochen altes Blattmaterial von *Arabidopsis thaliana* in einem Waring-Blender in 10 ml Homogenisationsmedium (330 mM Sorbit; 44 mM MES; 10 mM NaCl; 1 mM MgCl₂; 1 mM MnCl₂; 0,5 mM KH₂PO₄; 2 mM EDTA; 0,1 % (v/v) β-Mercaptoethanol; pH 6,1) pro Gramm Frischgewicht oder 10 ml Lysispuffer (10 mM Hepes/KOH(pH 7,8); 10 mM MgCl₂, 25 mM KCl) pro Gramm Frischgewicht homogenisiert. Das Homogenat wurde über zwei Lagen Miracloth filtriert und im GSA-Rotor bei 4 °C bis zum Erreichen einer Geschwindigkeit von 6000 UpM zentrifugiert. Das Sediment wurde in einem Volumen von 400-750 µl Lysispuffer (10 mM Hepes/KOH (pH 7,8); 10 mM MgCl₂, 25 mM KCl) mit Proteaseinhibitoren (Complete, Mini, EDTA-frei; Roche, Penzberg) pro vollem GSA-Zentrifugenbecher (während der Sedimentation) aufgenommen. Alle Arbeitsschritte wurden bei 4 °C durchgeführt.

12.12 Fraktionierung von Chloroplasten in Stroma und Membranen und Salzwäsche von Chloroplastenmembranen

Intakte Chloroplasten wurden wie in Abschnitt II.12.10 beschrieben isoliert. Nach dem letzten Waschschritt wurde das Chloroplastensediment jedoch nicht in Resuspendierungsmedium aufgenommen, sondern in Lysispuffer (10 mM Hepes/KOH(pH 7,8); 10 mM MgCl₂, 25 mM KCl), um die Chloroplasten aufzubrechen. Der Ansatz wurde für 10 Minuten auf Eis inkubiert, auf drei Corex-Röhrchen aufgeteilt und im Anschluss für 15 Minuten bei 10000 UpM im HB4-Ausschwingrotor bei 4 °C zentrifugiert. Die löslichen Proteine wurden mit dem Überstand abgenommen, vereinigt und mit 15 % (w/v) Endkonzentration Trichloressigsäure für 20 Minuten auf Eis gefällt. Nach 20 minütiger Zentrifugation bei 10000 UpM und 4 °C im HB4-Rotor wurden die pelletierten Proteine zweimal mit 80 % (v/v) Aceton gewaschen, getrocknet und im Anschluss in Probenpuffer (100 mM Natriumcarbonat, 10 % (w/v) Saccharose, 50 mM DTE) resuspendiert. Die Membranproteine wurden in 20 Volumen Lysismedium (Kontrollansatz), 200 mM NaCl, 10 mM Hepes/KOH, pH 7,8 bzw. 200 mM Natriumcarbonat resuspendiert, erneut sedimentiert und in Probenpuffer (100 mM Na₂CO₃, 10 % (w/v) Saccharose, 50 mM DTE) aufgenommen.

12.13 Solubilisierung plastidärer Proteine mit Hilfe von Digitonin

Chloroplastenmembranen wurden wie unter Abschnitt II.12.11 beschrieben isoliert und die Chlorophyllkonzentration mit Lysispuffer zunächst auf 2 mg/ml eingestellt. Zur Solubilisierung von Proteinen wurde die Suspension mit Digitonin (in Lysispuffer plus Proteaseinhibitoren (Complete, Mini, EDTA-frei; Roche, Penzberg)) ad 0,02-1 % (w/v) versetzt und die Chlorophyllkonzentration auf 1 mg/ml eingestellt. Die Solubilisierung wurde für 30-40 Minuten auf einem Rotor bei 4 °C durchgeführt. Nichtsolubilisiertes Material wurde durch 30 minütige Zentrifugation bei 4 °C und 15000 g sedimentiert. Aliquots der Solubilisierungsüberstände wurden auf einem SDS-Gel aufgetragen oder zur Auftrennung der solubilisierten Proteine im Saccharose-Dichtegradienten, zur Quervernetzung und zur Affinitätschromatographie verwendet (Abschnitt II.12.15 - 17).

12.14 2D-(Blue Native-/SDS-) Gelelektrophorese

Für die native Auftrennung solubilisierter Membrankomplexe auf einem Polyacrylamidgel, wurden zunächst Thylakoidmembranen wie in Kapitel II.12.11 beschrieben mit Lysispuffer homogenisiert. Die Resuspendierung erfolgte abweichend in ACA-Puffer (750 mM ϵ -Aminocaprinsäure; 50 mM Bis-Tris; 0,5 mM EDTA; pH 7,0). Die Solubilisierung wurde entsprechend mit 1% (w/v) Endkonzentration Digitonin und 1 mg/ml Chlorophyll in ACA-Puffer durchgeführt. Nach der Zugabe von n-Dodecyl- β -D-Maltosid ad 0,5 % (w/v) wurden die Proben zur Auftrennung in einem nativen Gradienten-Polyacrylamidgel mit 1/10 Volumen Probenpuffer (50 mM Bis-Tris (pH 7,0); 750 mM ϵ -Aminocaprinsäure; 30 % Saccharose; 5 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau 250G) versetzt. Das Probenvolumen richtete sich nach der Größe der verwendeten Gele (Hoefer Mighty Small, Dicke 0,1 cm: 20 μ g Chlorophylläquivalent; BioRad xL (BioRad, München), Dicke 0,75: 70-80 μ g Chlorophylläquivalent)

Das verwendete Gelsystem wurde von Schägger und von Jagow entwickelt (Schägger et al., 1994). Es bestand aus einem Trenngel (6-12 % (w/v) Polyacrylamid (Acrylamid/Bisacrylamid = 30/0,8 %); 500 mM ϵ -Aminocaprinsäure, 50 mM Bis-Tris (pH 7,0)) und einem Sammelgel (4 % (w/v) Polyacrylamid; 500 mM ϵ -Aminocaprinsäure, 50 mM Bis-Tris (pH 7,0)). Zur Herstellung des Trenngels wurde ein Gradientenmischer verwendet. Zur Stabilisierung des Gradienten wurde die 12%ige Lösung mit 20 % (w/v) Glycerin beschwert. Als Anodenpuffer wurde 50 mM Bis-Tris (pH 7,0) eingesetzt. Als Kathodenpuffer dienten 50 mM Tricin, 15 mM Bis-Tris (pH 7,0) und 0,02 % Coomassie Brilliant Blau 250G.

Bei größeren Gelen (BioRad xL System) wurde die Elektrophorese bei 150 V gestartet. Sobald die Proben das Sammelgel erreicht hatten, wurde die Spannung auf 750-1000 V erhöht. Wurden Minigele verwendet, so wurde während der Elektrophorese eine konstante Spannung von 150 V beibehalten. Sobald die Coomassie Blau-Lauffront etwa die Hälfte bis zwei Drittel des Trenngels durchwandert hatte, wurde der blaue Kathodenpuffer im Tank durch farbstofffreien Kathodenpuffer mit ansonsten derselben Zusammensetzung ausgetauscht. Die Gele wurden während des Laufs auf 4 °C gekühlt.

Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die nativ aufgetrennten Proteinkomplexe in der zweiten Dimension durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese in ihre Untereinheiten aufgegliedert. Dazu wurden die Gelbahnen mit einem scharfen Skalpell oder einer Rasierklinge ausgeschnitten und zunächst für 15 Minuten in frisch angesetztem Solubilisierungspuffer (66 mM Na₂CO₃; 2 % (w/v) SDS; 0,67 % (v/v) β-Mercaptoethanol) inkubiert. Anschließend wurden die Gelstreifen mit 1 % (w/v) Agarose in 125 mM Tris/HCl (pH 6,8) auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufpolymerisiert.

12.15 Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation plastidärer Membrankomplexe

Mit 1 % (w/v) Digitonin solubilierte Proteine der Chloroplastenmembranen wurden ad 0,5 % (w/v) mit n-Dodecyl-β-D-maltosid versetzt und kurz auf Eis inkubiert. 500 µl dieser Suspension wurden auf einen linearen Saccharosegradienten (0,1-1,0 M Saccharose in Lysiummedium mit 0,06 % (w/v) n-Dodecyl-β-D-maltosid) geschichtet. Der Gradient wurde zuvor mit Hilfe eines Gradientenmischers gegossen. Zur Auftrennung der plastidären Proteinkomplexe wurde der Gradient für 16,5 h bei 19000 UpM (≈45500 g) und 4 °C im SW40Ti-Rotor in einer Ultrazentrifuge (L7-55 bzw. L8-M, Beckman) zentrifugiert. Die Gradienten wurden bei 4 °C mit Hilfe eines Gradientenernters (Beckman) in 1 ml-Fractionen vom Boden des Zentrifugenröhrchens her geerntet. Zur Fällung der Proteine wurden die einzelnen Fractionen ad 15 % (w/v) mit Trichloressigsäure versetzt und für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Zur Sedimentation der gefällten Proteine wurde für 20 Minuten bei 4 °C und 14000 UpM in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Die Proteine wurden zweimal mit Aceton gewaschen, getrocknet, anschließend in je 30 µl Probenpuffer mit SDS (100 mM Na₂CO₃; 10 % (w/v) Saccharose; 50 mM DTE; 2,5 % (w/v) SDS) resuspendiert und für weitere Analysen auf einem SDS-Gel aufgetrennt.

12.16 Einsatz von quervernetzenden Agenzien zur Suche von HCF173-Interaktionspartnern

Um schwache oder kurzzeitige Wechselwirkungen zwischen zwei Proteinen zu stabilisieren, können quervernetzende Agenzien eingesetzt werden, die die Interaktionen durch kovalente Bindungen fixieren. Solche Agenzien unterscheiden sich hinsichtlich ihrer reaktiven Gruppen, ihrer Länge, der Spaltbarkeit durch z.B. reduzierende Reagenzien und ihrer Wasserlöslichkeit. In dieser Arbeit wurde mit den beiden Quervernetzern DSP (Dithiobis[succinimylpropionat]) und DTSSP (3,3'-Dithiobis[sulfosuccinimylpropionat]) gearbeitet (Abb. 7). Diese Agenzien sind homobifunktionale *N*-Hydroxysuccinimidester, die mit primären Aminogruppen reagieren. Die Quervernetzung kann aufgrund einer Disulfidbrücke im 12 Å langen Spacer-Arm von DSP bzw. DTSSP wieder aufgehoben werden. Da DSP keine geladenen Gruppen besitzt, ist es wasserunlöslich. Durch seine lipophilen Eigenschaften ist es membranpermeabel. DTSSP stellt aufgrund der Sulfonierung das wasserlösliche Äquivalent zu DSP dar.

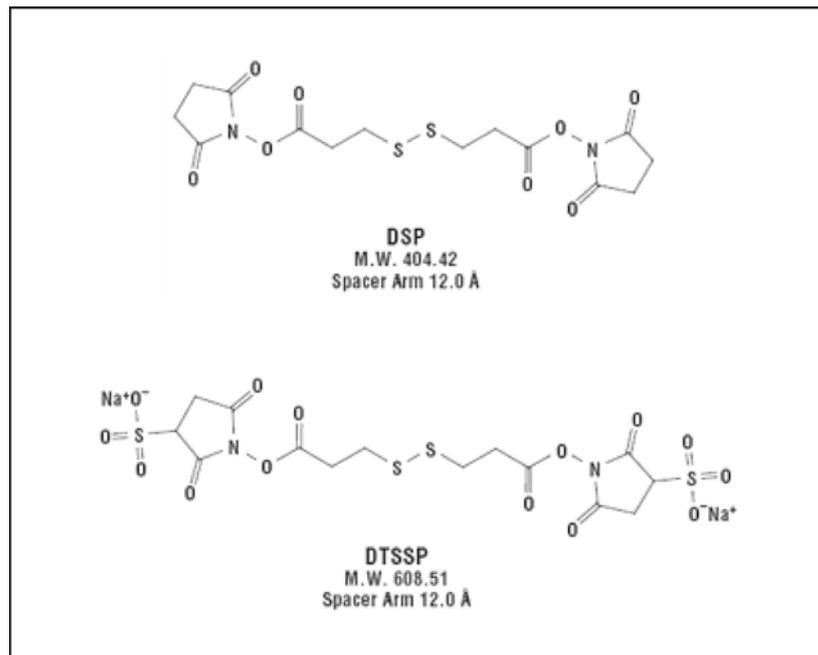


Abb. 7: Strukturformeln der quervernetzenden Agenzien Dithiobis[succinimyl]propionat] (DSP) und 3,3'-Dithiobis[sulfosuccinimyl]propionat] (DTSSP)

Für die Quervernetzung von HCF173 mit seinen möglichen Interaktionspartnern wurden Chloroplastenmembranen und deren Proteine wie unter II.12.11 erläutert isoliert und mit 1 % (w/v) Digitonin solubilisiert. Zur Herstellung einer 10 mM Stammlösung wurden die quervernetzenden Agenzien in kleinen Aliquots abgewogen und erst kurz vor ihrem Einsatz in Wasser (DTSSP) bzw. DMSO (DSP) gelöst. Diese Stammlösungen wurden zur Quervernetzung der solubilisierten Membranproteine/-Komplexe mit Endkonzentrationen von 0,05 mM, 0,1 mM, 0,2 mM, 0,35 mM und 0,5 mM DTSSP bzw. DSP eingesetzt. Die Chlorophyllkonzentration in den Ansätzen betrug 330 µg/ml, die DMSO Konzentration in den einzelnen Ansätzen der DSP-Vernetzung 0,5 % (v/v). Die Proben wurden für 1,5 – 2 Stunden auf einem Rotor bei 4 °C inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurde den einzelnen Proben Tris/HCl (pH 7,5) ad 50 mM Endkonzentration zugesetzt, um die Quervernetzungsreaktion abubrechen.

12.17 Affinitätschromatographie etikettierter HCF173-Proteine zur Identifizierung von Interaktionspartnern von HCF173

Aufgrund der verschiedenen Etikettierungen der HCF173-Fusionsproteine bot sich die affinitätschromatographische Aufreinigung von HCF173 und seinen potentiellen Interaktionspartnern über verschiedene Säulenmaterialien an. Das HCF173-TAP-Protein zeichnet sich durch die Kombination zweier Tags aus, die durch eine TEV-Protease-Schnittstelle voneinander getrennt sind: dem Protein A-Tag und einer Calmodulinbindedomäne, die unter Einfluss von Calcium an Calmodulin binden kann. Zur Aufreinigung des Fusionsproteins über den Protein A-Teil des Etiketts wurde IgG-Sepharose eingesetzt, zur Aufreinigung über die Calmodulinbindedomäne eine Calmodulin-Sepharose.

Das zweite Fusionsprotein ist mit einem dreifachen Etikett des Hämagglutinin- (HA-) Epitops ausgestattet und erlaubte die Aufreinigung über eine Anti-HA-Matrix (s. Abb. 5 und 8)

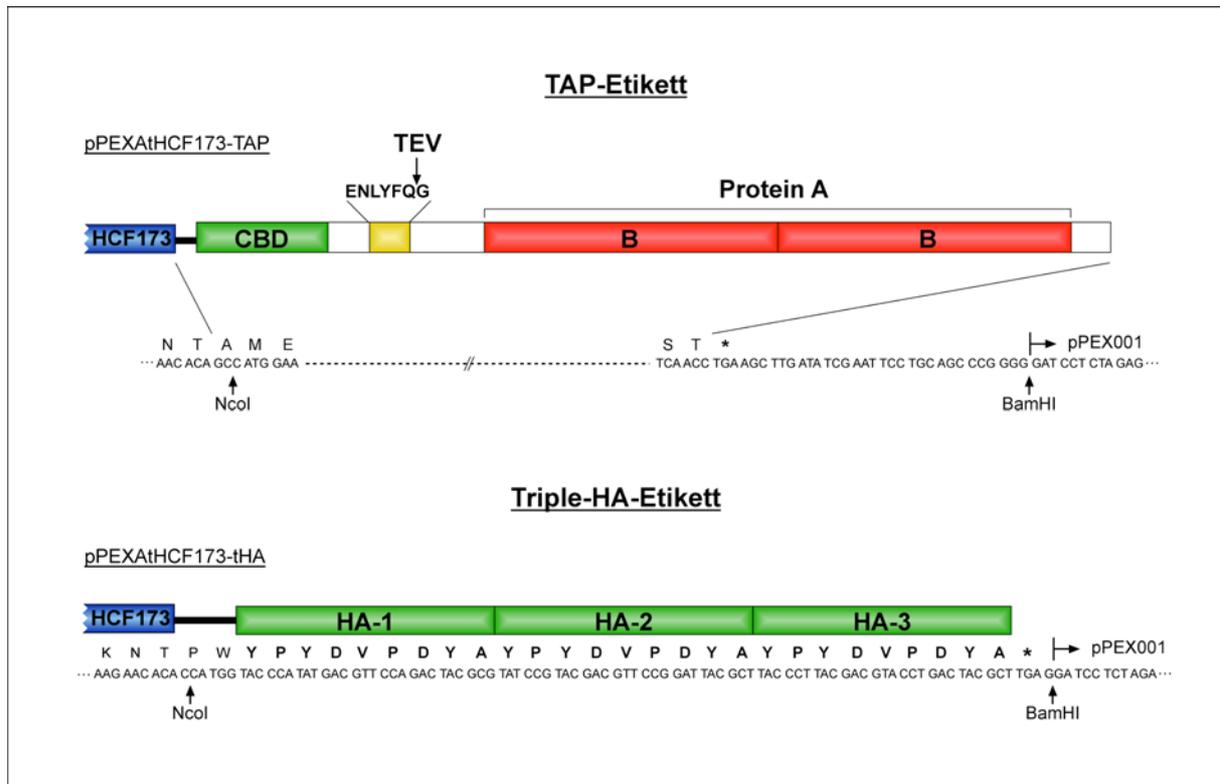


Abb. 8: Schematische Darstellung der eingesetzten Proteinetiketten. Das TAP- (Twin Affinity Purification-) Etikett setzt sich aus einer Calmodulin-Bindedomäne (CBD) und zwei IgG-Bindedomänen (B) des Protein A von *Staphylococcus aureus* zusammen. Diese Domänen sind durch eine TEV-Protease-Schnittstelle miteinander verbunden. Das Triple-HA-Etikett besteht aus drei tandemartigen Wiederholungen des HA- (Hämagglutinin-) Epitops. Zusätzlich sind die Klonierungsstellen und die zugehörigen Sequenzen der Komplementationsvektoren pPEXAtHCF173-TAP und pPEXAtHCF173-tHA angegeben.

12.17.1 Affinitätschromatographie über IgG-Sepharose

12.17.1.1 Elution von HCF173-TAP durch Glycin, Natriumthiocyanat, SDS und Harnstoff

Chloroplastenmembranen aus etwa 70 - 100 g Blattmaterial von sechs Wochen alten mit HCF173-TAP komplementierten Pflanzen wurden wie unter II.12.11 beschrieben isoliert und mit 1 % (w/v) Digitonin solubilisiert. Der Solubilisierungsüberstand wurde zu ca. 1/10 Volumen IgG-Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare, Uppsala, Schweden) gegeben und für 2 Stunden auf einem Rotor bei 4 °C inkubiert. Die IgG-Sepharose war zur Vorbereitung dreimal mit Waschpuffer (10 mM Hepes/KOH, pH 7,8; 150 mM NaCl, 0,1 % (w/v) n-Dodecyl- β -D-Maltosid) gewaschen worden. Nach der Bindung der Proteine an die IgG-Sepharose wurde die Säule mit 20 Volumen Waschpuffer gespült, um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen. Die Elution wurde mit verschiedenen Lösungen durchgeführt, um die besten Bedingungen (sauer, chaotrope Ionen, denaturierend) auszutesten. Es wurde schrittweise mit insgesamt 3,5 bis 4,5 Volumen (hinsichtlich des Bettvolumens des Säulenmaterials) 100

mM Glycin (pH 3) in 150 mM NaCl, 3 M Natriumthiocyanat, 8 M Harnstoff bzw. 1 % (w/v) SDS eluiert. Die Eluate wurden mit 15 % (w/v) Endkonzentration Trichloressigsäure gefällt, sedimentiert, mit 80 %igem Aceton gewaschen und in Probenpuffer mit SDS (100 mM Na₂CO₃; 10 % (w/v) Saccharose; 50 mM DTE; 2,5 % (w/v) SDS) resuspendiert.

12.17.1.2 Elution von HCF173-TAP durch Inkubation mit TEV-Protease

Chloroplastenmembranen aus etwa 70 - 85 g Blattmaterial von sechs Wochen alten Wildtyp- und HCF173-TAP-komplementierten Pflanzen wurden wie unter II.12.11 beschrieben isoliert und mit 1 % (w/v) Digitonin solubilisiert. Die Solubilisierungsüberstände von je 9,5 ml wurden ad 0,5 % (w/v) mit n-Dodecyl- β -D-Maltosid und ad 10 mM mit Tris (pH 8) versetzt und zu je 500 μ l IgG-Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare, Uppsala, Schweden) gegeben und für 2 Stunden auf einem Rotor bei 4 °C inkubiert. Die IgG-Sepharose war zur Vorbereitung dreimal mit Waschpuffer (10 mM Tris/HCl, pH 8; 150 mM NaCl; 0,1 % (w/v) Digitonin; 0,06 % (w/v) n-Dodecyl- β -D-Maltosid) gewaschen worden. Das Säulenmaterial wurde nach der Inkubation mit den solubilierten Proteinen zunächst mit 100 Volumen Waschpuffer und im Anschluss mit 10 Volumen TEV-Proteasepuffer (10 mM Tris/HCl, pH 8; 150 mM NaCl; 0,5 mM EDTA; 1 mM DTT; 0,1 % (w/v) Digitonin; 0,06 % (w/v) n-Dodecyl- β -D-Maltosid) gewaschen. Zur Elution von HCF173-TAP mit seinen potentiellen Interaktionspartnern wurden die Proben in fünf Bettvolumen TEV-Proteasepuffer mit 100 U rekombinanter TEV-Protease (Invitrogen, Karlsruhe) auf einem Rotor inkubiert. Die Inkubation erfolgte für 2 Stunden bei 18 °C. Das Eluat wurde aufgefangen und mit 2 Bettvolumen TEV-Proteasepuffer nachgespült. Die Proteine wurden mit Trichloressigsäure gefällt.

12.17.2 Affinitätschromatographie über eine Calmodulin-Matrix

Die affinitätschromatographische Aufreinigung von HCF173-TAP mit Hilfe einer Calmodulinmatrix wurde nach der Methode von Puig (Puig et al., 2001) durchgeführt. Zur Vorbereitung wurde die Calmodulin-Sepharose (Calmodulin Affinity Resin, Stratagene, Heidelberg) dreimal mit Calmodulin-Bindepuffer (10 mM β -Mercaptoethanol; 10 mM Tris/HCl, pH 8,0; 150 mM NaCl, 1 mM Magnesiumacetat; 1 mM Imidazol; 2 mM CaCl₂; 0,1 % (w/v) Tergitol (= NP40)) gewaschen.

Membranproteine aus etwa 80 - 100 g Blattmaterial von sechs Wochen alten Wildtyp- und HCF173-TAP-komplementierten Pflanzen wurden wie unter II.12.11 beschrieben isoliert und mit 1 % (w/v) Digitonin solubilisiert. Solubilisierungsüberstände von je 17,5 ml wurden mit 3 ml Calmodulin-Bindepuffer und 6 μ l 0,5 M CaCl₂ pro eingesetztem Milliliter Solubilisierungsüberstand versetzt, zu je 600 μ l Calmodulin-Sepharose gegeben und für 2 Stunden auf einem Rotor bei 4 °C inkubiert. Im Anschluss wurden die Ansätze in Plastiksälchen gegeben und mit 100 Volumen Calmodulin-Bindepuffer gewaschen. Zur Elution wurden 5 Bettvolumen Calmodulin-Elutionspuffer (10 mM β -Mercaptoethanol; 10 mM Tris/HCl, pH 8,0; 150 mM NaCl, 1 mM Magnesiumacetat; 1 mM Imidazol; 2 mM EGTA; 0,1

% (w/v) Tergitol (= NP40)) eingesetzt. Die eluierten Proteine wurden mit Trichloressigsäure gefällt.

12.17.3 Affinitätschromatographie über eine Anti-HA-Matrix

Die Anti-HA Affinity Matrix (Roche, Indianapolis, USA) wurde vor der Affinitätschromatographie mit 20 Volumen Äquilibrationpuffer (20 mM Tris, pH 7,8 °C bei 20 °C; 150 mM NaCl; 0,1 mM EDTA) und 10 Volumen Lysispuffer (20 mM Tris/HCl, pH 7,8 bei 4 °C; 10 mM MgCl₂; 25 mM KCl) gewaschen.

Mit 1 % (w/v) Digitonin solubilisierte Membranproteine, die aus ca. 15 g Blattmaterial von Wildtyp- bzw. mit HCF173-tHA komplementierten Pflanzen gewonnen wurden, wurden ad 0,5 % (w/v) mit n-Dodecyl- β -D-Maltosid versetzt. Diese Proben wurden zu 150 – 200 μ l Bettvolumen Anti-HA-Matrix gegeben und für 1,5 Stunden auf einem Rotor bei 4 °C inkubiert. Die Matrix wurde bei Raumtemperatur mit 20 Bettvolumen Waschpuffer (20 mM Tris, pH 7,8 bei 20 °C; 150 mM NaCl; 0,1 mM EDTA; 0,1 % (w/v) Digitonin; 0,05 % (w/v) n-Dodecyl- β -D-Maltosid) mit Proteaseinhibitoren (Complete, Mini, EDTA-frei; Roche, Penzberg) gewaschen. Das Ende der Waschung wurde durch Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 280 nm spektralphotometrisch überprüft. Die Elution erfolgte kompetitiv durch Inkubation des Säulenmaterials mit HA-Peptid (Roche, Indianapolis). Das HA-Peptid wurde zu diesem Zweck mit einer Konzentration von 1 mg/ml in Äquilibrationpuffer mit RNase-Inhibitoren gelöst. Die Elution erfolgte durch 15-minütige Inkubation der Säulenmatrix mit einem Bettvolumen HA-Peptid in Äquilibrationpuffer bei 37 °C. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt, die Eluate vereinigt und die Proteine mit Trichloressigsäure gefällt. Die Säulen wurden mit 20 Bettvolumen Regenerierungspuffer (100 mM Glycin, pH 2,0) und anschließender Waschung mit 20 Bettvolumen Äquilibrationpuffer regeneriert.

12.17.4 Nachweis plastidärer Transkripte in den Eluaten der Anti-HA-Affinitätschromatographie

Um RNA als mögliche Komponente eines HCF173-Komplexes zu detektieren, wurde die Anti-HA-Affinitätschromatographie wie unter 12.17.3 beschrieben durchgeführt. Die Eluate wurden mit 80 μ g tRNA als Fällungshilfe aus Hefe versetzt, im Anschluss mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) extrahiert und die Nukleinsäuren mit 0,3 M Natriumacetat (pH 6,0) und 2 Volumen Ethanol bei –20 °C über Nacht gefällt. DNA-Kontaminationen wurden durch halbstündige Behandlung der Proben bei 37 °C mit DNase I in Gegenwart von RNase-Inhibitoren entfernt. Nach Hitzeinaktivierung der DNase I in Gegenwart von 0,4 mM EDTA wurde die isolierte RNA durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben und nachfolgend über PCR amplifiziert. Für beide Reaktionen wurden genspezifische Primer verwendet (psaC-H, psaC-R, psbA-H, psbA-R, psbB-H, psbB-R, psbE-H, psbE-R, psbH-H, psbH-R, petB-H, petB-R, atpF-H, atpF-R, rbcL-H und rbcL-R). Nach jedem dritten PCR-Zyklus (bis Zyklus 21) wurden Proben entnommen, die Nukleinsäuren über Agarosegele aufgetrennt, auf Nylonmembranen geblottet und mit

genspezifischen radioaktiven Sonden hybridisiert, die mit den oben genannten Primerpaaren über PCR hergestellt wurden. Die radioaktiven Signale, die die relativen RNA-Mengen in den Proben widerspiegeln, wurden im Phosphoimager ausgelesen und quantifiziert. Die Signalstärke wurde in einem Diagramm halblogarithmisch gegen die Anzahl der PCR-Zyklen aufgetragen. In der exponentiellen Phase der PCR lagen die aufgetragenen Werte für Wildtyp und HCF173-tHA jeweils auf einer Geraden. Diese Geraden besitzen in der exponentiellen Phase einen parallelen Verlauf. Für einen ausgesuchten PCR-Zyklus in der exponentiellen Phase wurden die relativen RNA-Mengen der HCF173-tHA-Affinitätschromatographie zu den relativen RNA-Mengen der wt-Affinitätschromatographie ins Verhältnis gesetzt.

12.18 Hemmung der plastidären Translation durch Chloramphenicol und Lincomycin

Wildtyp-Pflanzen und homozygote *hcf173*-Mutanten wurden unter den in Punkt II.2 beschriebenen Bedingungen steril kultiviert. Allerdings wurden sie unter kontinuierlicher Lichtapplikation angezogen, um einen möglichst gleich bleibenden Transkriptpegel der einzelnen RNAs in den Keimlingen zu erhalten. Flüssigem 1/2 MS-Medium (Murashige und Skoog, 1962) (1 % (w/v) Saccharose; 0,5 g/l MES/NaOH, pH 5,7; 2,35 g/l MS-Salze) wurden die Antibiotika Chloramphenicol bzw. Lincomycin bis zu einer Konzentration von 450 mg/l beigefügt. Die etwa 3 Wochen alten Pflanzen wurden so auf das flüssige Medium umgesetzt, dass die Blätter auf der Oberfläche schwammen, um Transpiration zu ermöglichen. Die Hypokotyle wurden in der Nährlösung abgeschnitten. Die Pflanzen wurden in dieser Lösung für 3, 9 bzw. 27 Stunden in weiterhin kontinuierlichem Licht inkubiert. Kontrollpflanzen wurden in 1/2 MS-Medium ohne Translationsinhibitoren inkubiert. Proben für den 0 Stunden-Wert wurden direkt von den MS-Platten geerntet.

Die RNA aus diesen Pflanzen wurde mit Hilfe des RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden) isoliert. Die Nukleinsäurekonzentration wurde spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt und in allen Proben auf den gleichen Wert eingestellt. Die Vergleichbarkeit der RNA-Mengen wurde auf einem Agarosegel anhand der ribosomalen RNA überprüft. 4 µg einer jeden Probe wurden auf einem denaturierenden Gel aufgetrennt, geblottet und mit verschiedenen radioaktiv markierten Sonden hybridisiert. Die Signale wurden im Phosphoimager quantifiziert.

III. Ergebnisse

1. Charakterisierung der Mutante *hcf173*

1.1 In der Mutante *hcf173* ist das Photosystem II defekt, das Photosystem I ist funktional

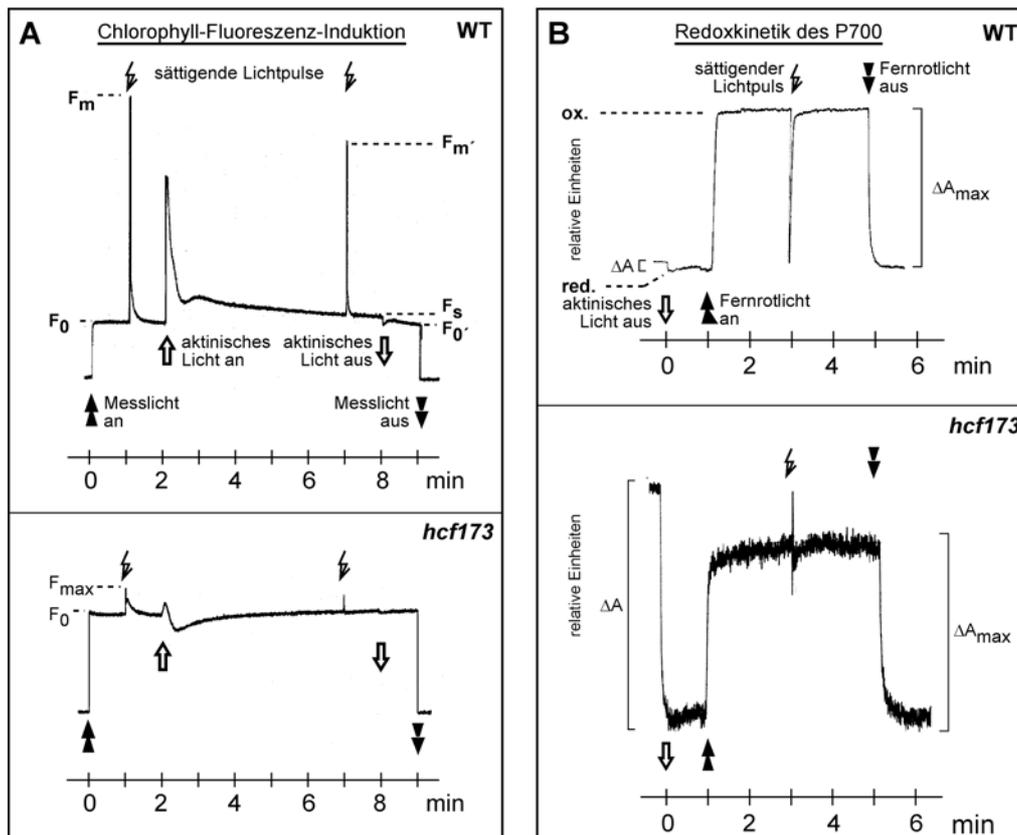


Abb. 9: Spektroskopische Analyse von Wildtyp-Pflanzen und *hcf173*-Mutanten. (A) Chlorophyll-Fluoreszenz-Induktion drei bis vier Wochen alter Wildtyp- bzw. homozygoter *hcf173*-Pflanzen. F_0 : Grundfluoreszenz nach Einschalten des Messlichtes, F_m : maximale Fluoreszenz nach Gabe eines sättigenden Weißlicht-Pulses, F_m' : maximale Fluoreszenz nach Gabe eines sättigenden Weißlicht-Pulses bei lichtadaptierten Pflanzen, F_s : photosynthetisches Fließgleichgewicht, F_0' : Grundfluoreszenz nach Ausschalten des aktinischen Lichtes. (B) Redoxkinetik des P700 von drei bis vier Wochen alten Wildtyp- bzw. *hcf173*-Pflanzen. ΔA : Absorptionsänderung nach Ausschalten des aktinischen Lichtes, ΔA_{max} : Absorptionsänderung nach Ausschalten des Ferrotlichtes.

Die Mutante *hcf173* wurde anhand ihres *hcf*-Phänotyps aus einer M_2 -Nachkommenschaft isoliert, die durch EMS-Mutagenese von *Arabidopsis thaliana*-Samen erhalten wurde. Immunoblotanalysen hinsichtlich der Akkumulation der Polypeptide der photosynthetischen Komplexe wiesen auf einen primären Effekt der Mutation auf das Photosystem II hin. Die zentralen Untereinheiten dieses Komplexes sind in der Mutante drastisch reduziert (s. I.4, Abb. 2). Als Sekundäreffekt tritt eine verminderte Akkumulation der PSI-Untereinheiten in der Mutante auf (Plücken et al., 2002). Um diese Beobachtungen zu bekräftigen, wurden zunächst Messungen der Chlorophyll-Fluoreszenz-Induktion der Mutante *hcf173* durchgeführt (Abb. 9A). Dabei zeigte sich, dass das Verhältnis von variabler Fluoreszenz

(Fv) zu maximaler Fluoreszenz (Fm) mit einem Wert von 0,15 in der Mutante im Vergleich zum Wildtyp mit einem Wert von 0,8 stark verringert ist (Tab. 5). Ein solch drastisch reduzierter Wert deutet auf einen starken Defekt in Photosystem II hin. Unterstützt wird diese Annahme durch eine deutlich reduzierte Quantenausbeute des Photosystem II (Φ II) in der Mutante (0,07) gegenüber dem Wildtyp (0,74). Das Photosystem II zeigt kaum Aktivität. Verglichen mit dem Wert von 0,97 im Wildtyp ist die photochemische Löschung der Fluoreszenz (qP) in der Mutante mit einem Wert von 0,74 allerdings kaum reduziert. Dies deutet darauf hin, dass die wenigen Elektronen, die vom Photosystem II abgegeben werden, relativ ungehindert die weitere photosynthetische Elektronentransportkette durchlaufen können und die übrigen photosynthetischen Komplexe aktiv sind. Messungen der P700-Redox-Kinetiken zeigten, dass durch Einstrahlung von dunkelrotem Licht eine Absorptionsänderung ausgelöst und P700 oxidiert wird und unterstützen somit diese Annahme (Abb. 9B). Die Gabe eines sättigenden Weißlichtpulses führt nur zu einer geringen Re-Reduktion des P700 und unterstützt damit die Aussage, dass nur wenige Elektronen das Photosystem II verlassen. Zusammengefasst weisen die spektroskopischen Untersuchungen also auf einen primären Defekt im Photosystem II hin.

Tab. 5: Fluoreszenzparameter der Chlorophyll-Fluoreszenz-Induktions-Messungen. Berechnung der Parameter siehe Material und Methoden (II.7.1). Die Parameter spiegeln den Mittelwert aus jeweils fünf unabhängigen Messungen an Wildtyppflanzen bzw. *hcf173*-Mutanten wieder.

	Fv/Fm	Φ II	qP
Wildtyp	0,80	0,74	0,97
<i>hcf173</i>	0,15	0,07	0,74

1.2 Die Transkriptmenge der *PsbA*-mRNA ist in *hcf173* stark reduziert

Um festzustellen, ob die reduzierten Proteinspiegel der Untereinheiten der beiden Photosysteme möglicherweise auf eine verringerte Akkumulation der entsprechenden Transkriptpegel zurückzuführen ist, wurden im Vorfeld dieser Arbeit bereits Northern-Blot Analysen mit spezifischen Sonden gegen Transkripte einiger ausgesuchter Untereinheiten (*AtpA*, *PetA*, *PetD*, *PsaA*, *PsaF*, *PsbA*, *PsbB* und *PsbD*) der photosynthetischen Komplexe durchgeführt. Es stellte sich heraus, dass von diesen ausgewählten Transkripten nur die *PsbA*-mRNA in starkem Ausmaß in der Mutante reduziert ist. Ihr Transkriptspiegel liegt bei ca. 25 % des wildtypischen Pegels. Die übrigen Transkriptpegel waren entweder nur leicht oder nicht betroffen (s.I.4, Abb. 3 und ohne Abbildung).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden weitere Sonden gegen Transkripte des Photosystems II eingesetzt, um zu klären, ob weitere Transkriptpegel in der Mutante verändert sind. Die plastidären Gene *psbE* (Cyt b559- α) und *psbF* (Cyt b559- β) sind Teil des *psbE*-Operons, *psbC* (CP43) liegt im *psbC/D*-Operon. Die mRNAs dieser Gene ergaben daher ein mehr oder weniger komplexes Muster im Northernblot (Abb. 10). Die Analyse der Transkriptpegel dieser Gene in der Mutante zeigte keine Unterschiede zum Wildtyp. Auch die Untersuchung der nukleärkodierten *psbO*- (34kDa-Untereinheit) und *psbP*-Transkripte (23kDa-Untereinheit)

ergaben keinen Unterschied zwischen Wildtyp und *hcf173* (ohne Abbildung). Das frühere Ergebnis bezüglich des *PsbA*-Transkriptpegels konnte bestätigt werden. Auch in diesem Versuch war die Menge an *PsbA*-mRNA in der Mutante auf ca. 25 % des Wildtypniveaus herabgesetzt.

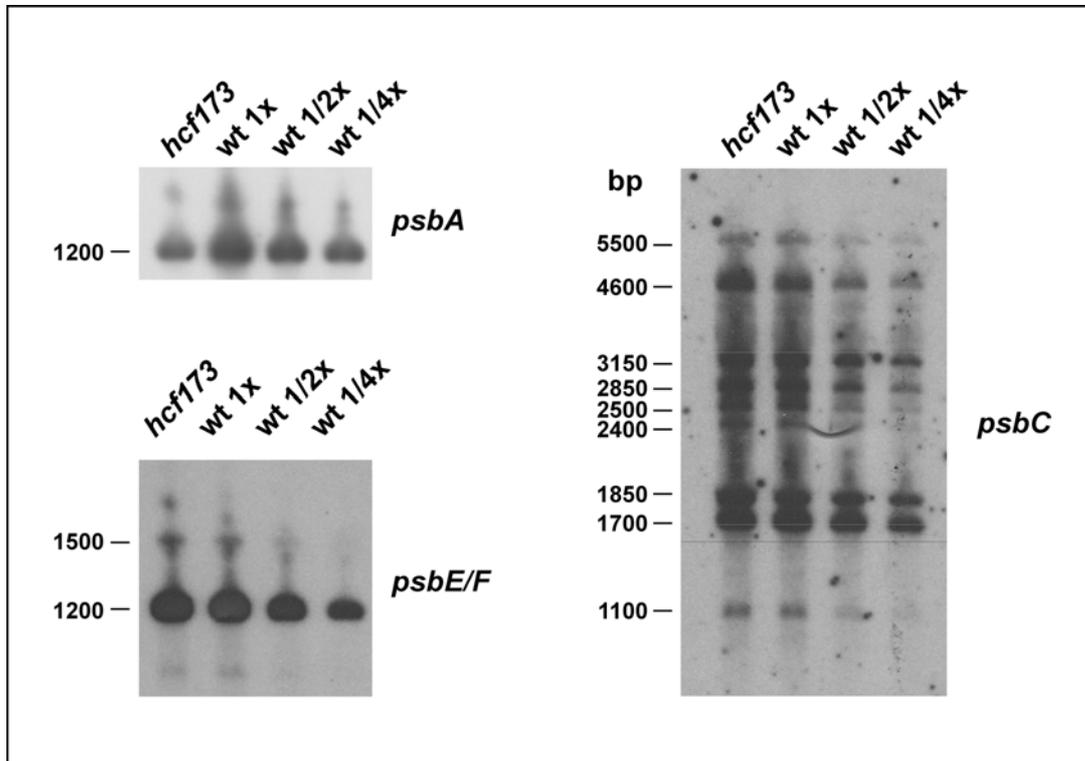


Abb. 10: Analyse plastidärer Transkripte von Wildtyp-Pflanzen und *hcf173*-Mutanten. Sechs Mikrogramm bzw. die angegebenen Verdünnungen Gesamt-RNA drei Wochen alter Wildtyp-Pflanzen bzw. *hcf173*-Mutanten wurden durch denaturierende Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit genspezifischen radioaktiv markierten Sonden hybridisiert.

1.3 Die Synthese des D1-Proteins ist in der Mutante *hcf173* deutlich herabgesetzt

Die verminderte Akkumulation der *PsbA*-mRNA in der Mutante gemeinsam mit der Tatsache, dass die Halbwertszeit der *PsbA*-RNA in der Mutante gegenüber der Halbwertszeit im Wildtyp etwa um den Faktor acht reduziert ist (Töller, 1999), lassen vermuten, dass die verringerte Akkumulation des D1-Proteins von einer verminderten Syntheserate herrührt. Um dies zu überprüfen, wurden die Syntheseraten plastidär codierter Untereinheiten der Thylakoidmembrankomplexe durch 30 minütige *in vivo* Markierung mit [³⁵S]-Methionin analysiert. Die cytoplasmatische Translation wurde durch die Zugabe von Cycloheximid unterbunden (II.12.8).

Das Markierungsmuster der Membranproteine von *hcf173* war mit dem des Wildtyps vergleichbar (Abb. 11A). Die Markierung der PS I-Untereinheiten (PsaA, PsaB), der ATP-Synthase (CF₁-α/β) und der PS II-Untereinheiten D2, CP47, CP43 und PsbH war in der Mutante nicht verändert. Die Markierung des D1-Proteins des PS II allerdings war drastisch

reduziert. Der Proteinspiegel an radioaktiv markiertem D1 entsprach etwa einem Achtel des markierten D1 im Wildtyp. Die Identifizierung der markierten Proteine wurde über Vergleiche mit früheren Markierungsexperimenten erzielt (Meurer et al., 1996a; Meurer et al., 1998). Zur eindeutigen Identifizierung des D1 Proteins wurde daher eine Immunopräzipitation mit den markierten Extrakten durchgeführt (II.12.8). Durch Zugabe spezifischer Antikörper konnte D1 quantitativ präzipitiert werden. Abbildung 11 B belegt, dass tatsächlich die Synthese von D1 drastisch reduziert ist und somit wohl primär für die fehlende Akkumulation von D1 verantwortlich ist.

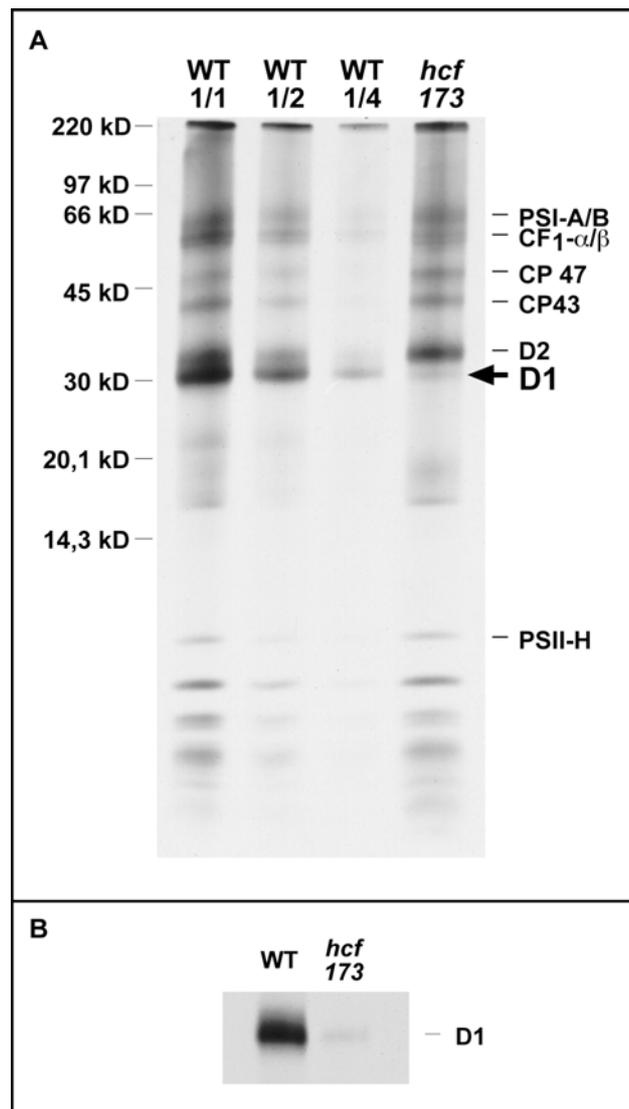


Abb. 11: *In vivo* Markierung plastidärer Proteine mit ^{35}S -Methionin. *De novo* synthetisierte Proteine von 15 Tage alten Wildtyppflanzen bzw. homozygoten *hcf173*-Mutanten wurden für 20 Minuten mit ^{35}S -Methionin markiert. (A) Membranproteine von Wildtyp-Pflanzen bzw. *hcf173*-1-Mutanten mit gleicher Menge an Radioaktivität (100.000 cpm) bzw. den angegebenen Verdünnungen wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und durch Fluorographie analysiert. (B) Immunopräzipitation von D1-Protein. Solubilisierte Membranproteine mit einem Radioaktivitätsäquivalent von 200.000 cpm wurden zur Immunopräzipitation mit Anti-D1 eingesetzt. Die *hcf173*-Probe wurde zuvor mit unmarkierten Wildtypmembranen versetzt, um gleiche Mengen an D1-Protein zu garantieren. Anti-D1 wurde im Überschuss eingesetzt.

1.4 Die reduzierte Synthese des D1-Proteins beruht auf einem Defekt in der Stabilisierung der *PsbA*-RNA und/oder in den primären Prozessen der Translationsinitiation

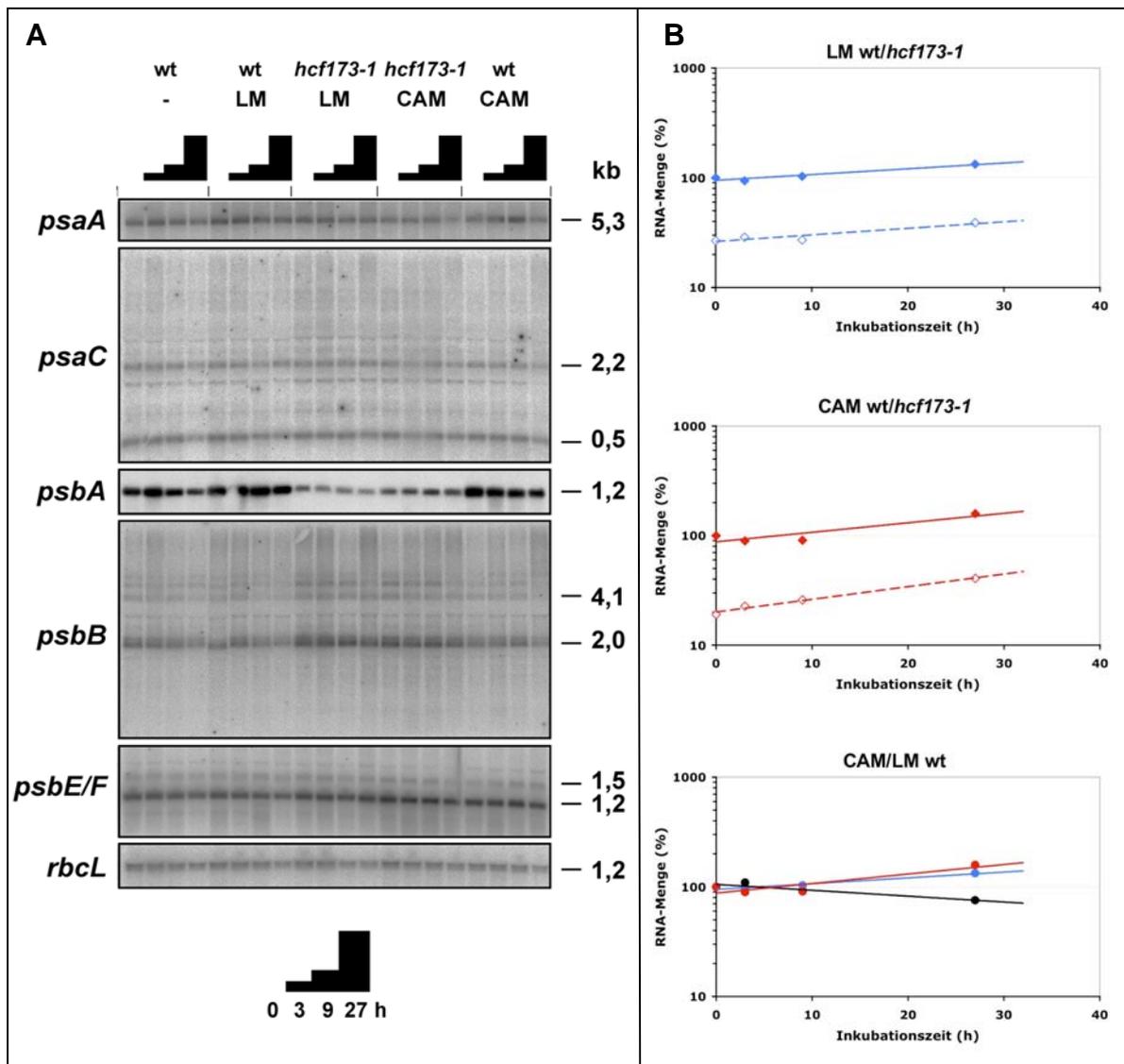


Abb. 12: Effekt von Translationsinhibitoren auf Pegel plastidärer Transkripte in *hcf173*. Drei Wochen alte Wildtyp-Pflanzen bzw. homozygote *hcf173*-Mutanten wurden mit den Antibiotika Lincomycin (LM) bzw. Chloramphenicol (CAM) in 1/2 MS-Medium inkubiert. Als Kontrolle diente eine Inkubation von Wildtyp-Pflanzen in 1/2 MS-Medium ohne Antibiotika (-). (A) Nach 0, 3, 9 und 27 Stunden Inkubationszeit wurde aus den Pflanzen RNA isoliert. Gleiche Mengen RNA wurden durch denaturierende Gelelektrophorese aufgetrennt, auf Nylonmembran transferiert und mit radioaktiv markierten genspezifischen Sonden hybridisiert. (B) Quantifizierung und Vergleich der *PsbA*-Transkriptmengen isoliert aus Wildtyp-Pflanzen (durchgezogene Linie) bzw. *hcf173-1* Mutanten (gestrichelte Linie) nach Inkubation mit Lincomycin (blau) bzw. Chloramphenicol (rot). Als Kontrolle wurden *PsbA*-Transkriptmengen von Wildtyp-Pflanzen bestimmt, die nicht mit Translationsinhibitoren inkubiert wurden (schwarz). Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Ergebnis von zwei unabhängigen Versuchen.

Um zu klären, ob die fehlende Stabilität der *PsbA*-mRNA in der Mutante einen direkten Effekt der Mutation darstellt oder nur durch sekundäre Effekte aufgrund der verringerten Syntheserate hervorgerufen wird, bieten sich Experimente mit Translationsinhibitoren an. Die Hemmung der plastidären Translation durch die Antibiotika Lincomycin und Chloramphenicol

hat in der Vergangenheit bereits zur Klärung dieses Aspektes bei anderen Mutanten mit verringerter RNA-Stabilität geführt (Meurer et al., 2002; Lezhneva und Meurer, 2004). Sowohl Lincomycin als auch Chloramphenicol hemmen spezifisch das Peptidyl-Transferase-Zentrum und damit die Elongation der Translation der 70S-Ribosomen durch Bindung an die 23S-rRNA der großen ribosomalen Untereinheit (Schlünzen et al., 2001; Schlünzen et al., 2003). Lincomycin verhindert durch Wechselwirkung mit den A- und P-Bindestellen freier Ribosomen bzw. 50S-Untereinheiten die Positionierung der tRNA-Moleküle und blockiert so die Bildung der ersten Peptidbindungen (Schlünzen et al., 2001; Schlünzen et al., 2003). Mit Polysomen interagiert das Antibiotikum nicht (Vazquez, 1979). Durch die Verhinderung neuer Translationszyklen werden Transkripte in einen ribosomenfreien Zustand überführt (Edhofer et al., 1998; Kallia-Raftopoulos und Kalpaxis, 1999). Chloramphenicol behindert die Bindung der Aminoacyl-tRNA an der A-Bindestelle des Ribosoms und blockiert auf diese Weise die Bildung neuer Peptidbindungen (Schlünzen et al., 2001; Schlünzen et al., 2003). Im Gegensatz zu Lincomycin interagiert Chloramphenicol auch mit Polysomen und die Ribosomen werden durch den Einsatz des Antibiotikums an die Transkripte gebunden (Vazquez, 1979; Nierhaus und Wittmann, 1980). Durch Applikation der Translationsinhibitoren Lincomycin und Chloramphenicol sollten Effekte möglicher Defekte in Translationselongation und -termination auf die RNA-Stabilität maskiert werden. Die *PsbA*-RNA sollte in den Mutanten über einen Versuchszeitraum von 27 h auf Wildtypniveau akkumulieren. Defekte, die direkt die RNA-Stabilität und die frühe Phase der Translationsinitiation, an der nur die 30S- Untereinheit des Ribosoms und verschiedene Initiationsfaktoren beteiligt sind, beeinflussen, wären weiterhin sichtbar und die Akkumulation der *PsbA*-Transkripte bliebe aus.

Zur Durchführung des Experimentes (II.12.18) wurden Wildtyppflanzen und *hcf173*-Mutanten unter kontinuierlicher Lichtgabe angezogen, um gleich bleibende Transkriptpegel in den Pflanzen zu garantieren. Die Hemmung der plastidären Translation wurde durch Zugabe der Antibiotika zu flüssigem Nährmedium induziert. Als Kontrolle wurden Wildtyppflanzen mit Nährmedium ohne Antibiotika inkubiert. Nach 0 h, 3 h, 9 h und 27 h wurde die Inkubation beendet und RNA aus den Keimlingen isoliert. Jeweils gleiche Mengen RNA wurden durch Northernblotexperimente analysiert. Es wurden sowohl der Transkriptspiegel der *PsbA*-mRNA als auch die Pegel verschiedener anderer plastidärer Transkripte (*PsaA*, *PsaC*, *PsbB*, *PsbE/F* und *RbcL*) als Kontrolle bestimmt (Abb. 12A). Zur späteren Quantifizierung wurden ebenfalls die Pegel der 16S-rRNA bestimmt (ohne Abbildung).

Schon die optische Auswertung von Abbildung 12A legt nahe, dass sich die *PsbA*-mRNA in der Mutante durch Applikation von Lincomycin bzw. Chloramphenicol nicht anhäufen lässt, so dass ein primärer Defekt der Genexpression auf Ebene der Translationselongation und -termination ausgeschlossen werden kann. Die quantitative Auswertung bezüglich dieses Transkriptes weist zwar auf eine leichte Anhäufung der *PsbA*-mRNA unter Einfluss der Antibiotika hin (Abb. 12B), allerdings war dieser Effekt auch bei den entsprechenden wildtypischen Vergleichspflanzen zu beobachten. Bei Pflanzen, die nicht mit Antibiotikum inkubiert wurden, blieb er aus. Aus diesem Grund ist die leichte Akkumulation der *PsbA*-mRNA spezifisch für die Behandlung mit Lincomycin bzw. Chloramphenicol und nicht für die Mutation.

Zusammengefasst zeigt dieser Versuch, dass die mangelnde Stabilität der *PsbA*-mRNA in der Mutante entweder auf einen direkten Defekt in der RNA-Stabilisierung zurückzuführen ist oder aber die frühen Prozesse der Translationsinitiation gestört sind.

2. Isolierung des Gens *HCF173* und Komplementation des mutanten Phänotyps

2.1 Der *HCF173*-Locus wurde als das Gen *At1g16720* identifiziert

Da die Mutante *hcf173* Teil einer EMS-Mutanten-Kollektion ist, musste das Gen *HCF173* mit Hilfe von molekularen Markern kartiert werden. Durch Grobkartierung mit homozygoten Mutanten der F₂ der Kartierungspopulation und dem Beginn der Feinkartierung mit 428 F₃-Familien der Kartierungspopulation konnte der *HCF173*-Locus bereits auf einen Abschnitt zwischen den molekularen Markern SNP634 (BAC-Klon T16N11) und SNP397 (BAC-Klon F20D23) auf dem oberen Arm von Chromosom 1 eingeschränkt werden. Dieser Bereich umfasste ca. 470 kb.

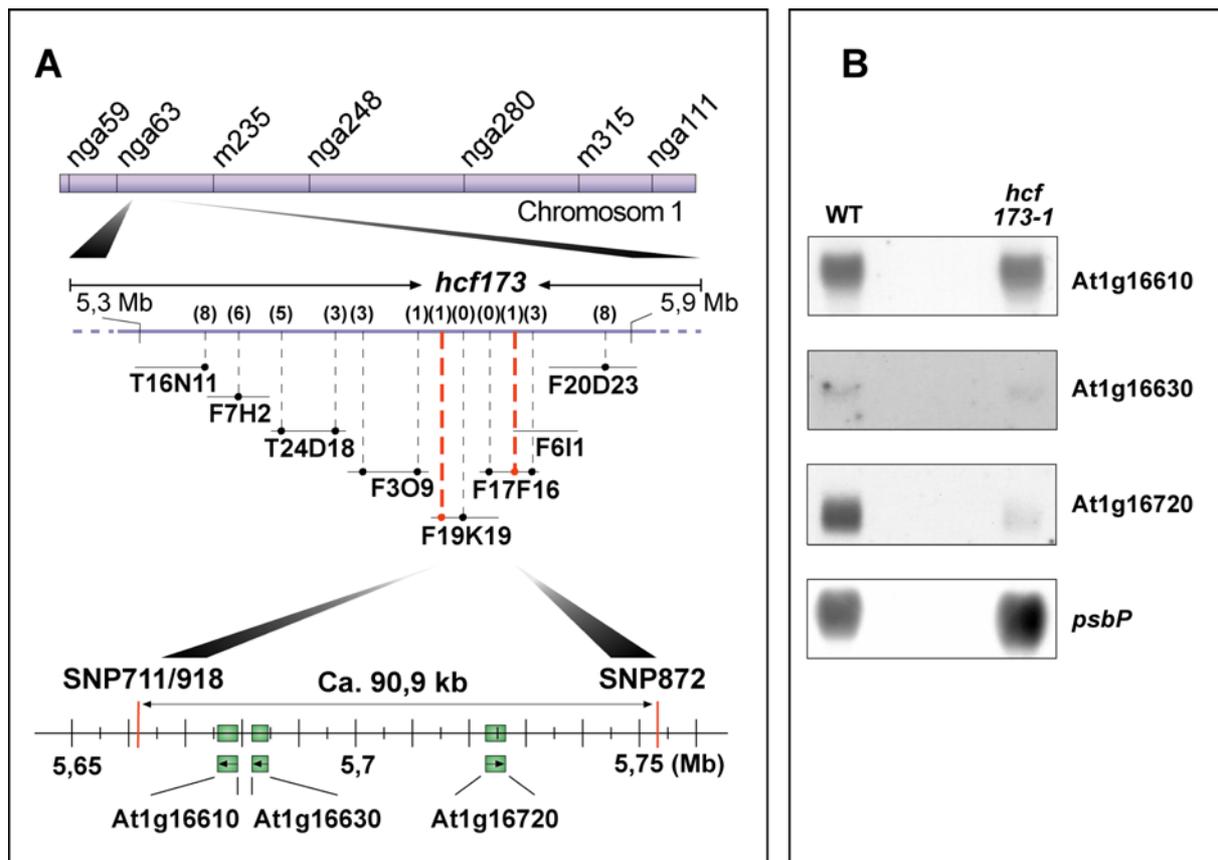


Abb. 13: Identifizierung des Gens *HCF173*. (A) Mit einer Gesamtzahl von 1279 Individuen wurde der *HCF173*-Locus zwischen den Markern SNP711/918 (BAC-Klon F19K19) und SNP872 (BAC-Klon F17F16) auf dem oberen Arm von Chromosom 1 kartiert. Die Zahlen in den Klammern geben die Anzahl Rekombinationsereignisse an, die bezüglich des verwendeten Markers detektiert wurden. Im kartierten Bereich wurden drei Gene identifiziert, die in ihrer Nukleinsäuresequenz eine plastidäre Transitsequenz codieren (grün). (B) Transkriptanalyse der Kandidatengene. Fünf Mikrogramm Poly(A⁺)-RNA, isoliert aus Wildtyp- bzw. *hcf173-1* Mutanten-Pflanzen, wurden mit Hilfe denaturierender Agarosegelelektrophorese aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit genspezifischen radioaktiv markierten Sonden hybridisiert. Kontrolle: *psbP*

Für die weitere Kartierung wurde die untersuchte Kartierungspopulation um 851 F2-Individuen vergrößert. Somit standen insgesamt 1279 F2-Individuen bzw. F3-Familien zur Verfügung. Durch die Analyse der genomischen DNA der Kartierungspopulation mit Hilfe genetischer Marker (II.10.3, Tab. 4) konnte der *HCF173*-Locus genauer bestimmt werden (Abb. 13A). Die letzten Rekombinationsereignisse wurden mit den Markern SNP711/918 (BAC Klon F19K19) und SNP872 (BAC Klon F17F16) detektiert.

Der Chromosomenabschnitt zwischen diesen Markern umfasste immer noch 91 kb und war somit zu groß, um die Identität des Gens *HCF173* eindeutig zu klären. Insgesamt lagen in diesem Bereich 29 Gene. Um die Zahl der Kandidatengene einzuschränken, wurden die Sequenzen dieser Gene mit dem Programm ChloroP (Emanuelsson et al., 1999) analysiert, um Gene zu identifizieren, deren Produkte im Chloroplasten aktiv sein sollten. Für drei der 29 Gene (At1g16610, At1g16630 und At1g16720) wurde vorhergesagt, dass sie Proteine mit einem Chloroplastentransitpeptid im N-Terminus kodieren (Abb. 13A). Nach Isolation von Poly (A⁺)-RNA aus Wildtyppflanzen und homozygoten *hcf173*-Mutanten wurden die Transkriptspiegel der verbliebenen Kandidatengene mit genspezifischen Sonden durch Northernblot analysiert (Abb. 13B). Der reduzierte Transkriptpegel des Gens At1g16720 deutete auf eine Mutation in diesem Gen hin. Die Sequenzanalyse des At1g16720-Allels aus *hcf173* bestätigte diese Vermutung und deckte einen Basenaustausch an Position 2524 in Exon 10 von insgesamt 13 Exons auf. Der Austausch von Cytosin nach Thymin fügte in diesem Fall ein frühzeitiges Stop-Codon in die Gensequenz ein (Abb. 14). Als Konsequenz kodiert At1g16720 in der Mutante ein verkürztes Protein, das entweder seine Funktion eingebüßt hat oder aber instabil ist und deshalb vermutlich die Reduktion der Transkriptmenge zur Folge hat. Durch den Basenaustausch entstand zusätzlich eine neue Schnittstelle für das Restriktionsenzym MaeIII, die eine Unterscheidung der Mutante von Wildtyp- und heterozygoten Pflanzen auf molekularer Ebene erlaubt (II.10.5).

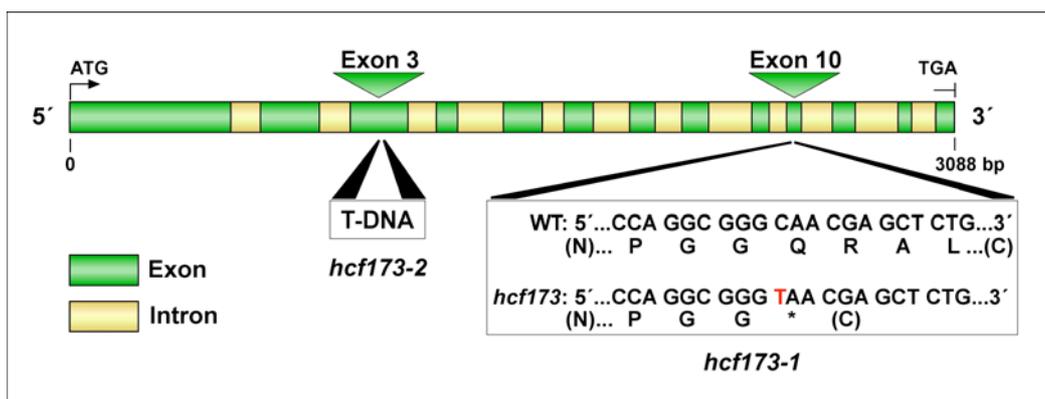


Abb. 14: Genstruktur von *HCF173*, *hcf173-1* und *hcf173-2* (GABI246C02). Das Gen *HCF173* weist eine Länge von 3088 bp auf. Es besteht aus 13 Exons (grün) und zwölf Introns (gelb). Die Sequenzanalyse des Allels *hcf173-1* deckte eine Punktmutation an Basenpaar 2524 in Exon 10 auf. Der Austausch von Cytosin nach Thymin führt ein vorzeitiges Stop-Codon in die Nukleinsäuresequenz ein. Der mutante Phänotyp des Allels *hcf173-2* wird durch eine T-DNA-Insertion in Exon 3 hervorgerufen.

2.2 Die *Arabidopsis thaliana* T-DNA-Insertionslinie 246C02 des GABI-Kat-Projektes repräsentiert das Allel *hcf173-2*

Nachdem die EMS-Mutation von *hcf173* in At1g16720 detektiert worden war, wurde die T-DNA-Insertionslinie 246C02 des GABI-Kat Projektes (Rosso et al., 2003) näher analysiert. Diese Linie trägt laut Herstellerangabe eine durch *Agrobacterium tumefaciens* vermittelte T-DNA-Insertion in Exon 3 von At1g16720 (Abb. 14) und sollte somit die Expression dieses Gens verhindern. Tatsächlich wiesen einige Pflanzen der gelieferten T2-Generation im UV-Licht den *hcf*-Phänotyp auf. Um zu bestätigen, dass die in Exon 3 inserierte T-DNA für diesen Phänotyp verantwortlich ist und dieser nicht möglicherweise durch weitere T-DNA-Insertionen hervorgerufen wurde, wurde ein Kopplungstest durchgeführt. Dazu wurden mit Hilfe zweier Linien der T3-Generation Segregationsanalysen hinsichtlich der Sulfadiazin-Resistenz, die über die T-DNA vermittelt wird, und des *hcf*-Phänotyps durchgeführt (Tab. 6).

Tab. 6: Segregationsanalyse von Sulfadiazinresistenz und *hcf*-Phänotyp. Die Aufspaltungsverhältnisse bezüglich der Sulfadiazinresistenz und des *hcf*-Phänotyps wurden mit Hilfe von zwei T3-Linien der T-DNA-Insertionslinien 246C02 des GABI-Kat Projektes (Rosso et al., 2003) bestimmt. Die Werte des χ^2 -Testes treffen eine Aussage über die Abweichung von den beobachteten zu den erwarteten Aufspaltungsverhältnissen. Eine Abweichung von den erwarteten Aufspaltungsverhältnissen ist statistisch signifikant, wenn die χ^2 -Werte > 3,84 ($P < 0,05$) sind.

Linie	Anzahl	Segregation Resistenz					Segregation Mutation bzgl. Sulf ^R				
		Anzahl Sulf ^R	Anzahl Sulf ^S	% Sulf ^R	% Sulf ^S	χ^2	Anzahl <i>hcf</i>	Anzahl wt	% <i>hcf</i>	% wt	χ^2
246C02-2	646	468	178	72,4	27,6	2,248	152	316	32,4	67,6	0,0769
246C02-7	591	440	151	74,5	25,5	0,095	147	293	33,4	66,6	0,0006
Wildtyp	48	0	48	0	100	/	0	0	0	0	/

Bei der Insertion einer einzelnen T-DNA in das Genom wurde eine Aufspaltung hinsichtlich der Sulfadiazin-Resistenz von 3:1 erwartet. Das bedeutet 75 % der Keimlinge müssten auf sulfadiazinhaltigem Nährmedium überleben. Für die Linie 246C02-2 wurden 72,4 % resistente Keimlinge gezählt, für die Linie 246C02-7 74,5 %. Somit gibt es in der Linie 246C02 nur einen T-DNA-Insertionsort. Die Daten bezüglich der Segregation des *hcf*-Phänotyps unterstützen dieses Ergebnis. Bei einer engen Kopplung von T-DNA und Mutation, wie es bei einer Insertion in die kodierende Sequenz eines Gens der Fall ist, müssten die Mutanten alle in der Gruppe der resistenten Keimlinge zu finden sein. Ihr Anteil an dieser Gruppe sollte 33 % betragen, während die übrigen 67 % die für die T-DNA heterozygoten Pflanzen einnehmen sollten, da der Wildtyp auf sulfadiazinhaltigem Medium nicht lebensfähig ist. Im Fall der Linie 246C02-2 zeigten 32,4 % der resistenten Keimlinge den *hcf*-Phänotyp, im Fall von 246C02-7 33,4 %. Somit entsprachen die Aufspaltungsverhältnisse genau den geforderten Bedingungen. Es konnte eindeutig dargelegt werden, dass der *hcf*-Phänotyp der Linie 246C02 mit der T-DNA-Insertion an einem einzelnen Locus gekoppelt ist.

Um zu beweisen, dass die Linie 246C02 ein Allel zur *hcf173*-EMS-Mutante darstellt, wurde ein Allelie-Test durchgeführt. Dazu wurden Pflanzen, die heterozygot bezüglich der EMS-Mutation waren, und Pflanzen, die hinsichtlich der T-DNA-Insertion heterozygot waren, miteinander gekreuzt. Die heterozygoten Pflanzen wurden im Vorfeld nach den unter II.10.5 beschriebenen Methoden über PCR selektiert. In Kreuzungsansatz A wurde die EMS-Linie als „Mutterpflanze“ eingesetzt, in Kreuzungsansatz B die T-DNA-Insertionslinie. Das erhaltene Saatgut wurde auf zuckerhaltigem Medium ausgelegt und die angezogenen Pflanzen auf die Expression des *hcf*-Phänotyps untersucht (Tab. 7).

Tab. 7: Segregationsanalyse der Nachkommenschaft des Allelietests bezüglich des *hcf*-Phänotyps. Für den Allelietest wurden heterozygote Pflanzen der *hcf173*-EMS-Linie mit heterozygoten Pflanzen der T-DNA-Insertionslinie gekreuzt. In Ansatz A diente die EMS-Linie als „Mutterpflanze“, in Ansatz B die T-DNA-Insertionslinie. Die Aufspaltungsverhältnisse der Nachkommenschaft bezüglich des *hcf*-Phänotyps wurden ermittelt. Die Werte des χ^2 -Testes treffen eine Aussage über die Abweichung von den beobachteten zu den erwarteten Aufspaltungsverhältnissen. Eine Abweichung von den erwarteten Aufspaltungsverhältnissen ist statistisch signifikant, wenn die χ^2 -Werte $> 3,84$ ($P < 0,05$) sind.

Kreuzungsansatz	Anzahl Pflanzen	Anzahl <i>hcf</i>	Anzahl wt	% <i>hcf</i>	% wt	χ^2
A	345	86	259	24,9	75,1	0,001
B	292	59	233	20,2	79,8	3,580

Bei allelischen Mutationen wird erwartet, dass wildtypische Pflanzen und *hcf*-Pflanzen im Verhältnis 3:1 vorliegen, der Anteil an *hcf*-Pflanzen also 25 % beträgt. Bei nicht-allelischen Mutationen wären alle Nachkommen wildtypisch. In beiden Kreuzungsexperimenten wies die Nachkommenschaft Pflanzen auf, die den *hcf*-Phänotyp zeigten (Ansatz A: 24,9 %; Ansatz B: 20,2 %). Somit konnte die Allelie der beiden Mutationen eindeutig bestätigt werden. Es kann davon ausgegangen werden, dass ein fehlendes oder defektes Produkt des Gens At1g16720 für den mutanten Phänotyp der *hcf173*-EMS-Mutante und der T-DNA-Insertionslinie verantwortlich ist und dass das Gen *HCF173* identisch ist mit At1g16720. Die Linie 246C02 wird ab sofort mit *hcf173-2* bezeichnet, die EMS-Linie mit *hcf173-1*.

Durch Immunoblotanalysen, *in vivo* Markierung *de novo* synthetisierter plastidärer Membranproteine mit [³⁵S]-Methionin und Northernblotanalysen konnte dargelegt werden, dass *hcf173-2* auch auf molekularer Ebene den gleichen Phänotyp wie *hcf173-1* zeigt (Abb. 15). So akkumulieren die repräsentativ ausgewählten Untereinheiten (D1, D2, CP43, CP47) des PS II in beiden Mutanten kaum. Sie machen nicht einmal ein Achtel der im Wildtyp akkumulierten Mengen aus. Die PsaA- und PsaB-Polypeptide des PS I entsprechen etwa 30 – 50 % der Wildtypmenge. Auf Ebene der Proteinsynthese wird die deutlich verringerte Synthese des D1-Proteins in *hcf173-2* offensichtlich. Der Transkriptspiegel der *PsaA*-mRNA ist in beiden Allelen etwa auf 25 % des Wildtypniveaus reduziert.

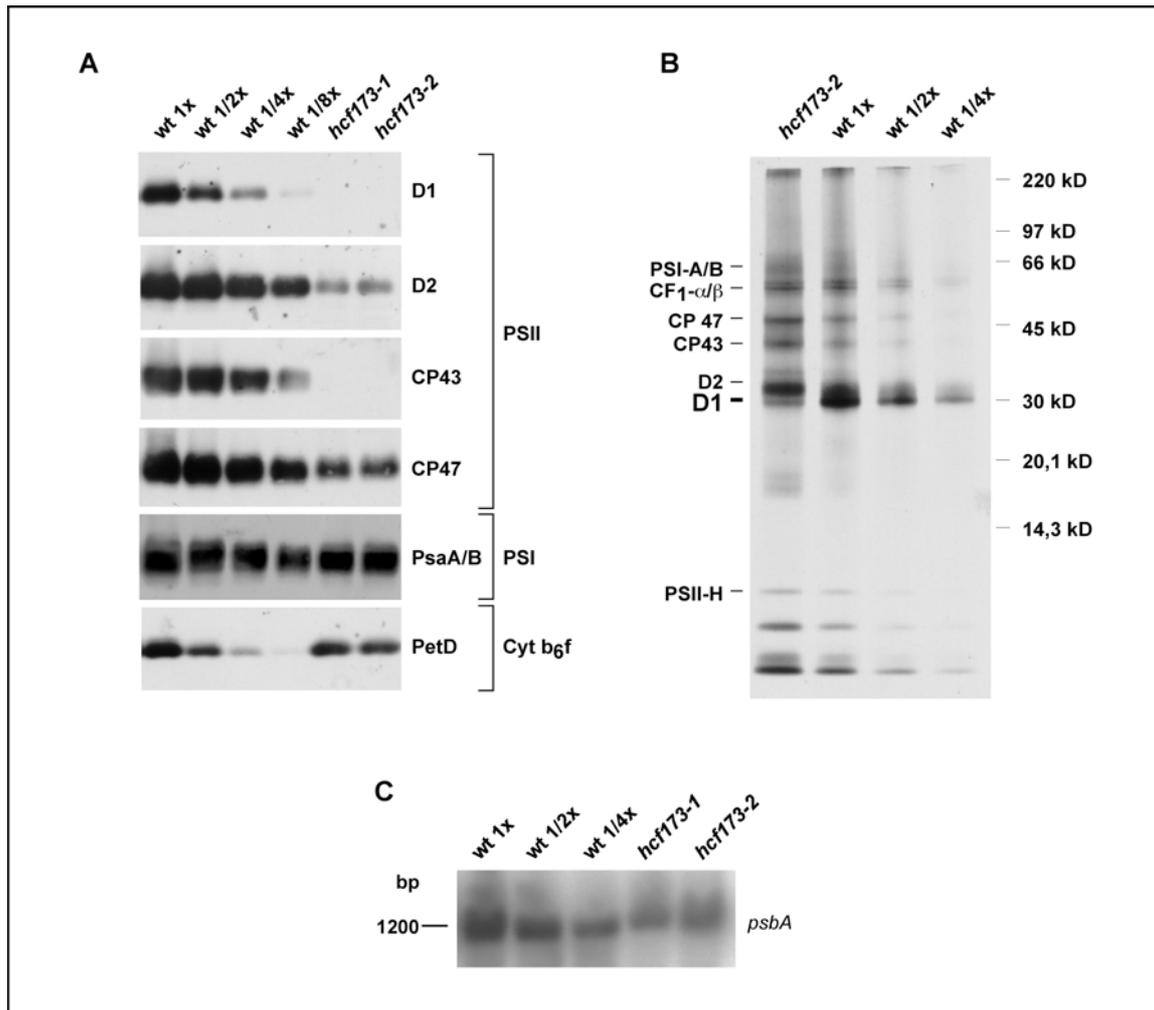


Abb. 15: Analyse plastidärer Proteine und Transkriptpegel der Mutante *hcf173-2*. (A) Immunoblotanalyse plastidärer Membranproteine. 20 µg Protein bzw. die angegebenen Verdünnungen wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und mit Hilfe spezifischer Antikörper nachgewiesen. (B) *In vivo* Markierung plastidärer Proteine mit [³⁵S]-Methionin. *De novo* synthetisierte Proteine 15 Tage alter Wildtyp- bzw. *hcf173-2*-Pflanzen wurden 20 Minuten mit [³⁵S]-Methionin markiert. Proteinmengen mit gleicher Radioaktivität bzw. den angegebenen Verdünnungen wurden über SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und durch anschließende Fluorographie analysiert. (C) Vier Mikrogramm bzw. die angegebenen Verdünnungen Gesamt-RNA, isoliert aus Wildtyp-, *hcf173-1* und *hcf173-2*-Pflanzen, wurden durch denaturierende Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit einer für das *PsbA*-Transkript spezifischen radioaktiven Sonde hybridisiert.

2.3 Die Transformation der Mutante *hcf173-1* mit der *HCF173*cDNA und zwei *HCF173*-Fusionsgenen komplementiert den mutanten Phänotyp

Um eindeutig zu beweisen, dass der Basenaustausch im Gen *HCF173* tatsächlich zu dem *hcf*-Phänotyp der Mutante *hcf173-1* führt, wurden Komplementationsanalysen durchgeführt. Dazu wurde zunächst die *HCF173*-cDNA wie unter Abschnitt II.10.2 beschrieben isoliert und kloniert. Durch Insertion in den Pflanzentransformationsvektor pPEX001 wurde die cDNA mit dem starken 35S-Promotor des Cauliflower Mosaic Virus fusioniert. Das Fusionskonstrukt (pPEXAtHCF173-2) wurde zunächst über Sequenzierung auf seine Intaktheit geprüft und im Anschluss durch Agrobakterien vermittelte Transformation mit Hilfe der „Floral-Dip“-Methode (Clough und Bent, 1998) in heterozygote *hcf173-1*-Pflanzen eingebracht. Die heterozygoten

Pflanzen konnten im Vorfeld aufgrund des Restriktions-Polymorphismus im mutanten Allel durch PCR-Analysen selektiert werden (II.10.5). Das erhaltene Saatgut der T₁-Generation wurde ausgesät und die Keimlinge auf Basta-Resistenz getestet. Die Herbizidresistenz konnte nur durch die transformierte T-DNA des pPEX001-Vektors vermittelt werden. Um sicherzustellen, dass nicht mangelnde Stringenz zur Selektion der Pflanzen führte, wurden diese wie unter II.10.6 beschrieben über PCR auf Anwesenheit der T-DNA überprüft. Für zwei von nachweislich 26 bastaresistenten Pflanzen konnte durch PCR und Restriktionsanalyse zusätzlich dargelegt werden, dass sie den homozygot mutanten Genotyp am *HCF173*-Locus trugen. Diese Pflanzen (*HCF173-c*) zeigten keinen *hcf*-Phänotyp mehr und die Messung ihrer Chlorophyll-Fluoreszenz-Induktion war mit der des Wildtyps vergleichbar (Abb. 16). Somit konnte einwandfrei bewiesen werden, dass die *HCF173*-cDNA in der Lage ist, die Mutante *hcf173-1* zu komplementieren und somit ein funktionstüchtiges Protein exprimiert wird.

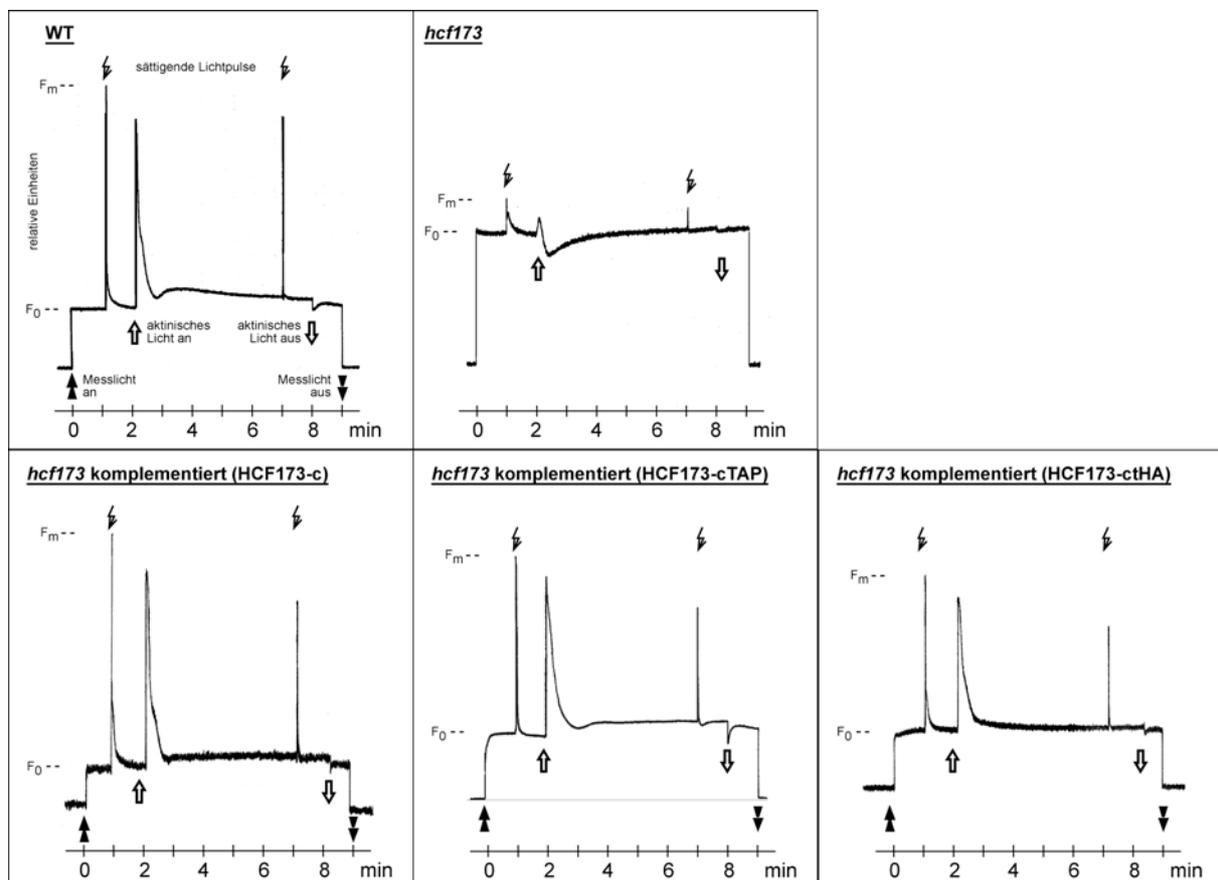


Abb. 16: Chlorophyll-Fluoreszenz-Induktion von Wildtyp-Pflanzen, *hcf173*-Mutanten und komplementierten Pflanzen (*HCF173-c*, *HCF173-cTAP*, *HCF173-ctHA*). Für die Messungen wurden drei Wochen alte Pflanzen eingesetzt. Die Abbildungen zeigen repräsentative Ergebnisse mehrerer unabhängiger Messungen. F_0 : Grundfluoreszenz nach Einschalten des Messlichtes, F_m : maximale Fluoreszenz nach Gabe eines sättigenden Weißlicht-Pulses.

Da für den Nachweis von HCF173 kein Antikörper zur Verfügung stand, wurden zusätzlich Mutanten mit cDNA-Fusionsgenen transformiert (II.10.4, Abb. 5). Diese kodierte Fusionsproteine, die im C-Terminus einen TAP-(Tandem Affinity Purification-) bzw. ein Triple-HA- (Hämagglutinin-) Epitop aufwiesen (Sato und Wada, 1997; Puig et al., 2001). Diese Proteinetiketten lassen sich durch kommerziell erwerbliche Antikörper nachweisen und

somit sollte indirekt auch HCF173 detektierbar sein. Das TAP-Etikett ist 183 Aminosäuren lang und gliedert sich in drei Bereiche: eine Calmodulin-Bindedomäne, eine TEV-Proteaseschnittstelle und einen Teil, der die beiden IgG-Bindedomänen B des Protein A von *Staphylococcus aureus* umfasst. Das HA-Etikett besteht aus drei HA-Peptiden von je 9 AS, die tandemartig hintereinander liegen (II.12.17, Abb. 8). Die Herstellung der Fusionsgene AtHCF173-TAP und AtHCF173-tHA und ihre Klonierung in den Pflanzentransformationsvektor pPEX001 erfolgte wie in Abschnitt 10.4 erläutert. Die Transformation und Selektion transformierter Nachkommen wurden analog zur Komplementation mit der cDNA durchgeführt. Insgesamt konnte für sieben von 85 nachweislich basta-resistenten mit AtHCF173-TAP komplementierten und fünf von 96 basta-resistenten mit AtHCF173-tHA komplementierten Pflanzen mit Hilfe von PCR und Restriktionsanalyse gezeigt werden, dass sie am *HCF173*-Locus homozygot mutant waren. Diese komplementierten Pflanzenlinien wurden mit HCF173-cTAP bzw. HCF173-ctHA bezeichnet. Die Messung der Chlorophyll-Fluoreszenz-Induktion dieser Komplementanten wies analog zu den HCF173-c-Pflanzen den für Wildtyp-Pflanzen charakteristischen Kurvenverlauf auf (Abb. 16).

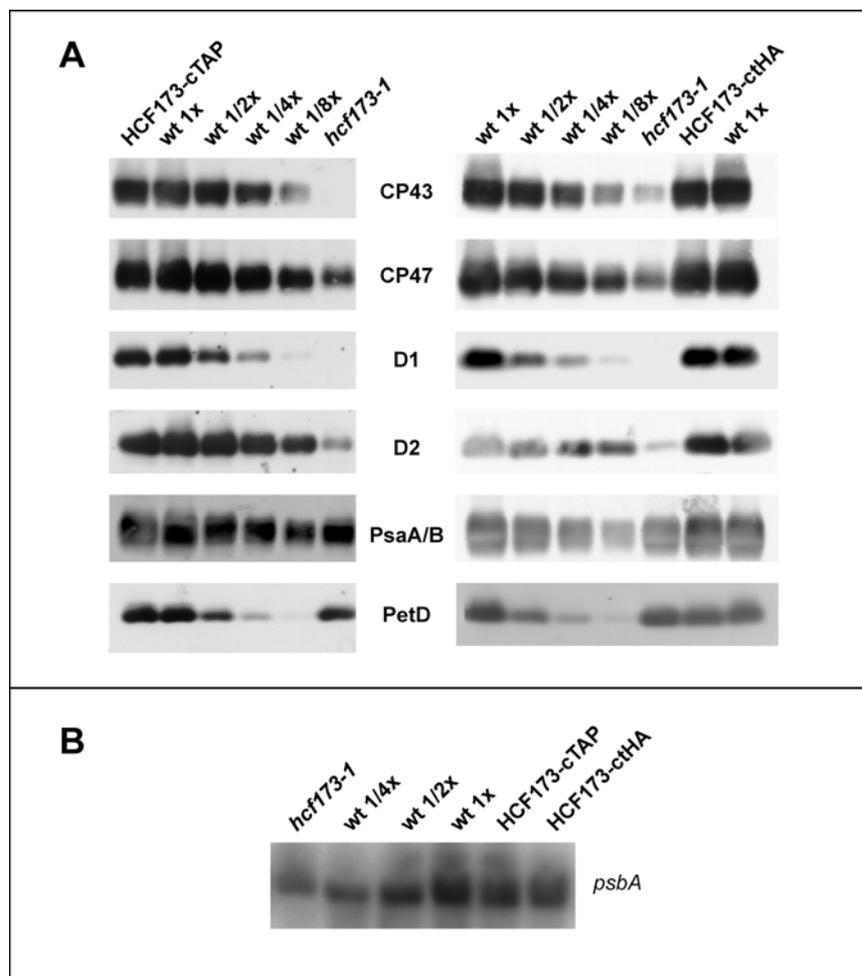


Abb. 17: Analyse plastidärer Protein- und Transkriptpegel in den Komplementanten-Linien HCF173-cTAP und HCF173-ctHA. (A) Immunoblotanalyse plastidärer Membranproteine. 20 µg Protein bzw. die angegebenen Verdünnungen wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und mit Hilfe spezifischer Antikörper nachgewiesen. (B) Vier Mikrogramm bzw. die angegebenen Verdünnungen Gesamt-RNA, isoliert aus Wildtyp-, *hcf173-1*-, HCF173-cTAP- und HCF173-ctHA-Pflanzen, wurden durch denaturierende Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit einer für das *PsbA*-Transkript spezifischen radioaktiven Sonde hybridisiert.

Um die Komplementation auf molekularer Ebene zu belegen, wurden aus HCF173-cTAP- und HCF173c-tHA Pflanzen Proteine isoliert und die Spiegel plastidärer Membranproteine überprüft. Abbildung 17A zeigt, dass die in der Mutante *hcf173-1* kaum vorhandenen Untereinheiten des PSII D1, D2, CP43 und CP47 in den Komplementantenlinien normal akkumulierten. Auch die Mengen der PsaA und PsaB Untereinheiten des PSI waren in Komplementantenlinien und Wildtyp vergleichbar. Auf Ebene der RNA konnte gezeigt werden, dass auch das *PsbA*-Transkript in den Linien HCF173-cTAP und HCF173-ctHA akkumulierte. Die RNA-Spiegel entsprachen dem des Wildtyps (Abb. 17B).

Die spektroskopische Analyse der Komplementanten und ihre Untersuchungen auf molekularer Ebene zeigen deutlich, dass auch die Fusionsproteine HCF173-TAP und HCF173-tHA dazu in der Lage sind, den mutanten *hcf173*-Phänotyp vollständig zu komplementieren. Da RNA- und Proteinspiegel der Komplementantenlinien vergleichbar zu denen des Wildtyps sind, müssen die beiden Fusionsproteine funktionell sein. Im Fall des HCF173-TAP-Proteins macht das Etikett mit ca. 20,5 kDa etwa ein Viertel des gesamten Proteins aus. Somit schränkt nicht einmal das Anhängen dieses großen Peptids die Funktion des HCF173-Proteins ein. Die mit Hilfe der Fusionsproteine erhaltenen Daten in Lokalisations- und Funktionsstudien sollten somit direkt auf HCF173 übertragbar sein.

3. Charakterisierung, Lokalisierung und Funktionsanalyse des Faktors HCF173

3.1 Das Protein HCF173 zeigt entfernte Ähnlichkeit zur Super-Familie der SDR-Proteine

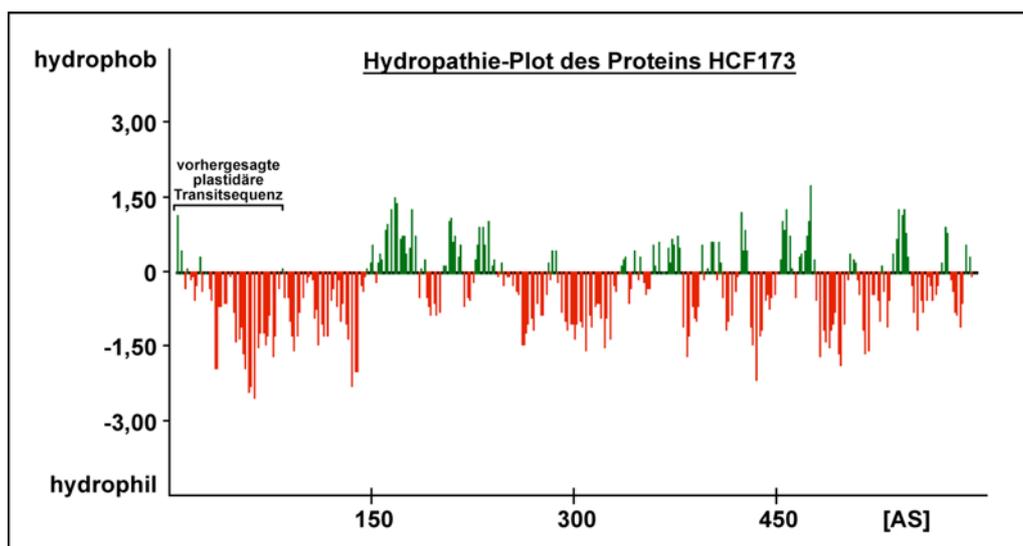


Abb. 18: Hydropathie-Plot des Proteins HCF173

Die cDNA von *HCF173* codiert ein Protein von 598 Aminosäuren und einem vorhergesagten Molekulargewicht von 65,7 kDa. Die Hydropathie-Analyse (Abb. 18) weist auf eine vierteilige Struktur des Proteins hin. Der N-Terminus von HCF173 zeigt bis zu Aminosäure 145 einen

hydrophilen Charakter. Diesem Bereich schließt sich bis Aminosäure 240 ein überwiegend hydrophober Teil an. Nach einem zweiten hydrophilen Bereich, der die Aminosäuren 241 bis 334 umfasst, folgen im C-Terminus Abschnitte mit abwechselnd hydrophoben und hydrophilen Eigenschaften. Die Analyse der Proteinsequenz mit den Programmen ChloroP (Emanuelsson et al., 1999) und WoLF PSORT (Horton, Manuskript in Vorbereitung), die Prognosen für den intrazellulären Wirkort des untersuchten Proteins erlauben, sagten eine plastidäre Transitsequenz im N-terminalen Bereich von HCF173 voraus. Die Transitsequenz soll die ersten 83 Aminosäuren des Proteins umfassen.

Datenbankrecherchen mit dem BLAST-Algorithmus (Altschul et al., 1997) deuteten an, dass in Reis zwei putative homologe HCF173-Proteine existieren (Abb. 19). OsHCF173-1 (BAD53796) ist 648 Aminosäuren lang und wird auf Chromosom 6 kodiert. OsHCF173-2 (BAD10524) hat eine Länge von 598 Aminosäuren und das entsprechende Gen ist auf Chromosom 2 lokalisiert. Laut Vorhersage des Programms WoLF PSORT besitzen beide Proteine eine Chloroplasten-Transitsequenz. Für OsHCF173-1 wird ein Transitsignal von 89 Aminosäuren vorhergesagt, für OsHCF173-2 von 83 Aminosäuren. In paarweisem Vergleich der prognostizierten reifen Aminosäuresequenzen ergibt sich für AthHCF173 und OsHCF173-1 eine Übereinstimmung der Sequenz für 74 % der Aminosäurereste und insgesamt eine Ähnlichkeit von 84 %. AthHCF173 und OsHCF173-2 weisen 74 % identische Aminosäurereste und insgesamt 86 % Ähnlichkeit auf.

Weiterhin besteht eine Ähnlichkeit zwischen AthHCF173 und dem UOS1-Protein aus Erbse und seinen Homologen (Abb. 19). UOS1 steht für UV-B and ozone similarly regulated protein 1. Anhand von RNA-Analysen konnte für Erbse gezeigt werden, dass der Transkriptpegel von *PsUOS1* unter Einfluss von UV-B-Strahlen oder alternativ durch Ozon-Begasung herabgesetzt wird (Sävenstrand et al., 2002). Die höchste Übereinstimmung ergibt sich für AthHCF173 zu den UOS1-Proteinen der Blaualgen *Nostoc sp.* PPC7120 (NP_489066) und *Anabaena variabilis* ATCC 29413 (ZP_0015944) (23% identisch, 38 % ähnlich). Die UOS1-Proteine aus Erbse (AAM19355) und *Arabidopsis thaliana* (NP_193616) zeigen 22 % bzw. 20 % identische Aminosäurereste zu AthHCF173 und insgesamt eine Ähnlichkeit von 35 %. Die genaue Funktion und der Wirkort der UOS-Proteine sind nicht bekannt, so dass keine Rückschlüsse auf die Funktion von HCF173 möglich sind.

Des Weiteren deckte die BLAST-Recherche Ähnlichkeiten der HCF173-Aminosäurereste 161 bis 260 und 461 bis 560 zu vielen anderen Proteinen auf, die zu einem Cluster von vorhergesagten Nukleosiddiphosphat-Zuckerepimerasen gezählt werden (COG0702; Cluster of orthologous groups (Tan und Troxler, 1999; Tatusov et al., 2000; Tatusov et al., 2003); ohne Abbildung). Nukleosiddiphosphat-Zuckerepimerasen sind Mitglieder der Superfamilie der kurzkettigen Dehydrogenasen/Reduktasen (SDR; short chain dehydrogenases/reductases). Aufgrund der nur teilweise erhaltenen Ähnlichkeit weist HCF173 lediglich eine entfernte Verwandtschaft zu dieser Proteinfamilie auf.

Zusammengefasst lässt sich also sagen, das HCF173 seine Wirkung höchstwahrscheinlich im Chloroplasten entfaltet. Es zeigt Ähnlichkeit zu der Familie der UOS1-Proteine und eine entfernte Verwandtschaft zu den SDR-Proteinen. Letztere begrenzt sich auf die Aminosäurereste 161 - 260 (SDR-like 1) und 461 – 560 (SDR-like 2). Da HCF173 keinem Protein mit bekannter Funktion ähnelt, ist eine Vorhersage über die genauere Funktion des Proteins nicht möglich.

```

AthCF173  MVGSLVGG-----SNMAATDAFLLSSNFGNS-----FSINTRIHRHEDRSQIVIPRAQSSSPSSPSSDKKTKT 65
OsHCF173-1  MAALIVAAARPPGGGAAAVIAYHHCASPSRALPLAAGPSAGGGVVVGRRYHHHGACCAAKPTQVAEVDQGGAAEPGVASANAAVEA 90
OsHCF173-2  MAAMSS-----RCAASSSSAFTRAPLPGG-----RHHQSGCGVAAGGAKTIVRVAALDT-EATAKAGKSS 63
AvUOS1
NsUOS1
PsUOS1
AtUOS1  -----MLFILFHACMLLKLKSLPLCKKSYTFIYLFHLHYLIALPFNLCCRAPKFPKRNFCOKISNPTLKKPFLQIYGKPH 73
AtUOS1  -----MEVSSSLKLSLSSLSFS-----IKLQGSSSSIDIKFSK-----YTSLEKPEFLQLDDKSR 49

AthCF173  REGTITTEKESPEVAKKLE-----VAPPSP-----QSEPSPTT-----TKLDD-----VNPVGLGRRSRQIFDEVWRKFSGLGQ 129
OsHCF173-1  KPRKKRNRSSRRGRKGRSSSSETRTTAVLEEEEEVEVKEKTEEDGEEGKRKEKAAGLDLDEVMAVSPVGLGRRSRQIFDEVWRKFSRLGQ 180
OsHCF173-2  MSTVASPEOEBOEGVLEFRGGGPMCFVAVPG-AODTTVLVVGATSRIGRIVVRKLMRLRGYNVKALVRRNDQEVIDMLPRSDVIVVGDVGD 130
AvUOS1  SRARRARRDGGEPGGSSS-----TALLALP-----THEDGGGG-----GGVALDDVIIVN-PVGLGRRSRQIFDEVWRKFSRLGQ 22
NsUOS1  -----MADKNRSQWNLCRFIEITLTYFE----- 22
PsUOS1  -----MADKNRSQWNLCRFIEITLTYFE----- 22
AtUOS1  KLIYEONSTKLSRPTHRAS-----ISAKSGRONWDLGRFIKTLTYFEN----- 115
AtUOS1  RLRDQQVSHSLELRSYRKR-----VTKASGSGQWDFGRFVKTLTYFEN----- 91
    
```



```

AthCF173  MSRTTRPDEOETLDSLLIREGPMCEFAVPG-AQNVTVLVVGATSRIGRIVVRKLMRLRGYNVKALVRRKQDEEVMMLPRSDVIVVGDVGD 218
OsHCF173-1  MSSASSTALABEEQAVLIRGGPMCEFAVPG-AODTTVLVVGATSRIGRIVVRKLMRLRGYNVKALVRRNDQEVIDMLPRSDVIVVGDVGD 269
OsHCF173-2  MSTVASPEOEBOEGVLEFRGGGPMCFVAVPG-AODTTVLVVGATSRIGRIVVRKLMRLRGYNVKALVRRNDQEVIDMLPRSDVIVVGDVGD 219
AvUOS1  -VIP-----FLNWWQQLIQGRPQDNQPRTDGNNMGVILVAGATGGVGRVVRKLRERGERVRLVLR-DIDKARSILGDDVIVVADITKE 106
NsUOS1  -VIP-----FLNWWQQLIQGRPQDNQPRTDGNNMGVILVAGATGGVGRVVRKLRERGERVRLVLR-DIDKARSILGDDVIVVADITKE 106
PsUOS1  -GPPSPAKFFDFLVGLSSSTSISVSNMCG--TSDIIVLVAGATGGVGRVVRKLRERGERVRLVLR-NEEKARKMLGSDVIVVADITKE 201
AtUOS1  -GPPSPLFVSSVFEKLTNGATEEPVREM--TSGIILVAGATGGVGRVVRKLRERGERVRLVLR-NEEKARKMLGPEIDVIVADITKE 177
    
```

SDR-like 1

```

AthCF173  STLKSAVPSCSKIIYCATARSTITGDLNRVD----HLGVNNTKAFQDYNNELAQLRAGK----SSKSKLLAKFKSASLSDGWEHROGT 300
OsHCF173-1  STVKSAVSGCSKIIYCATARSTITGDLNRVD----NOGVRNVSKAFQDYNNELAQLRAGK----SSKSKLLAKFKSAPRSLNGWEVDQGS 351
OsHCF173-2  SSVQAAVSGCCKKIIYCATARSTITGDLNRVD----NOGVRNVTKAFQDYNNELAQLRAGK----SSKSKLLAKFKSARSLDQWEVNVQGS 301
AvUOS1  ETLTPMNMANIQAIVICCTAVRIQPVVEGDTAPRAKYVGGVYQYQYQYQYQYQYQYQYQYQYQYQYQYQYQYQYQYQYQYQYQYQYQYQY 196
NsUOS1  ETLTPMNMANIQAIVICCTAVRVQPVVEGDTAPRAKYVGGVYQYQYQYQYQYQYQYQYQYQYQYQYQYQYQYQYQYQYQYQYQYQYQY 196
PsUOS1  SFLIPEYFKGVKVINAVSVIIVGPKEGDTPRAKYVGGVYQYQYQYQYQYQYQYQYQYQYQYQYQYQYQYQYQYQYQYQYQYQYQY 290
AtUOS1  NTLVPEKFKGVKVINAVSVIIVGPKEGDTPERQKYNQYRFFPEPEIKGDSPELVEYIGMKNLINAVRDVGVLENGKLIQVGD-NTFKDL 266
    
```

```

AthCF173  YFODTASQVYDGGDAKFEETETE-----RQFSCGVVTR--GGYVLSKRLSLPLGSLDRYDGLLVSVGGNGRSYVILEAGPSSDM 382
OsHCF173-1  YFNFASRREDECHDASFESEBAG-----QAVFSCGVVTR--GGYVLSKRLSLPLGSLDRYDGLLVSVGGNGRSYVILEAGPLADT 433
OsHCF173-2  YFODTASQVYDGGDAKFEETETE-----QAVFSCGVVTR--GGYVLSKRLSLPLGSLDRYDGLLVSVGGNGRSYVILEAGPLADT 383
AvUOS1  IWGALDDVVMGCVSASNIQLVEN-----TASFAGNVSTANSGGFASVTRRN-FEPPFNLSGYEGVLRVKGDCQRYKIFIRTTETKWDG 278
NsUOS1  IWGALDDVVMGCVSASNIQLVEN-----TALFAGNVSTANSGGFASVTRRN-FEPPFNLSGYEGVLRVKGDCQRYKIFIRTTETKWDG 278
PsUOS1  IWGALDDVVMGCVSSETFQIDNSNGSEGGPTGVFKGVSSANNGGFTSIRTKN-FSEPELDSAYDGLFRLKCGRRYKVIIRTSQDWD 379
AtUOS1  PWGALDDVVMGCVSSENFIVDLTAGENGPTGHEKCVSTNNNGEFTSIRTKN-FEAEVNSAYDGLFRLKCGRLYKVIIRTSQDWD 355
    
```

```

AthCF173  SOSKQYFARISTKAGFCRVRVVPSAFRPVN----PDDPPLDPLVHTLTIRFEPKQRQPVQGLACAOQDLSRFSLVFEVILKALPAGQET 467
OsHCF173-1  SOSKQYFARIMTKVGFRCRVRVVPSAFRPVN----PDDPPLDPLVHTLTIRFEPKQRQPVQGLACAOQDLSRFSLVFEVILKALPAGQET 517
OsHCF173-2  SOSKQYFARIMTKVGFRCRVRVVPSAFRPVN----PDDPPLDPLVHTLTIRFEPKQRQPVQGLACAOQDLSRFSLVFEVILKALPAGQET 467
AvUOS1  LGYSYSFD--TVENTWINIRPFAELVVPVFRAKIVQDAPPDSSRVSSFQMLMS---KFEYDGLNPKFSAGGVALQMBEIKAYG-CANT 362
NsUOS1  LGYSYSFD--TVENTWINIRPFAELVVPVFRAKIVQDAPPDSSRVSSFQMLMS---KFEYDGLNPKFSAGGVALQMBEIKAYG-CANT 362
PsUOS1  LGYTAFEN--TEKQKWSIQLPFSSRLFRFRARTVSDAPOFASNIASIQMLMS---KFEYDGLNETFAEGPELVPVSSIKAYINDPIT 464
AtUOS1  VGYTASFD--TSPQWQSVRLPSSRLRFPFRARTVTDAPPFNASSIISIQMLMS---KFEYDGLNETFAEGPELVPVSSIRAYIQDPVT 440
    
```

SDR-like 2

```

AthCF173  DFILVSCVSGSVEENRR-----EQVLKAKRAGEDSLRRSGLGYTIIRPGPLKEEPPGQORALIFDQGNRISQGISCAVD 540
OsHCF173-1  DFILVSCVSGSVEENRR-----EQVLKAKRAGEDSLRRSGLGYTIIRPGPLKEEPPGQORALIFDQGNRISQGISCAVD 590
OsHCF173-2  DFILVSCVSGSVEENRR-----EQVLKAKRAGEDSLRRSGLGYTIIRPGPLKEEPPGQORALIFDQGNRISQGISCAVD 539
AvUOS1  PKFVLVSSAGVTRPGRPGINLDEEPPAVRLNDQLGGILTWKLKGEDSLRSGIPIYTIIRPCALTEEPGS-KALIFBOGDNIRGKTSREVD 451
NsUOS1  PKFVLVSSAGVTRPGRPGINLDEEPPAVRLNEQLGGILTWKLKGEDSLRSGIPIYTIIRPCALTEEPGS-KALIFBOGDNIRGKTSREVD 451
PsUOS1  PRFVHVGSAGVTRPERPGLDLSKQPPAVRLNKELDFILTYKLGKEDSLRSGIPIYTIIRPCALTEEPAG-ADLIFBOGDNITGKTSREEV 553
AtUOS1  PRFVHVGSAGVTRPERPGLDLSKQPPAVRLNKELDFILTYKLGKEDSLRSGIPIYTIIRPCALTEEPAG-ADLIFBOGDNITGKTSREVD 529
    
```

```

AthCF173  ADICVKALHDSTARNKSFVDC-----HEYVAEQGDELYELVAHLDPKANNVLPALSVLEKNT 598
OsHCF173-1  ADICVKALHDSTARNKSFVDC-----HEYVAEQGDELYELVAHLDPKANNVLPALSVLEKNT 648
OsHCF173-2  ADICVKALHDSTARNKSFVDC-----HEYVAEQGDELYELVAHLDPKANNVLPALSVLEKNT 598
AvUOS1  AELCVQALQQ-KRCNVTFEVR-----EGTNVAEVDWQOLFVNLEPDR----- 493
NsUOS1  AELCVQALQQ-KRCNVTFEVR-----EGTNVAEVDWQOLFVNLEPDR----- 493
PsUOS1  AQMCVAAOSPYACDRHFBVKSVIPFSEPTVDPENPPPEKDYDIYFKSLKEGITGKEALQONPIPV-- 620
AtUOS1  ARICTAALAESYANLNTFEBVKSTVFPSEPTVDPENPPPEKDYNYFKTLRKGITGKEALEOSTVAV-- 596
    
```

Abb. 19: Sequenzvergleich von HCF173 aus *A. thaliana* (AthHCF173) mit putativen homologen Proteinen aus Reis (OsHCF173-1/OsHCF173-2) und Proteinen der UOS1- (Uv and ozone similarly regulated protein 1) Familie. Die Enden der vorhergesagten plastidären Transitsequenzen sind durch ein Kästchen markiert. Zu AthHCF173 identische Aminosäuren wurden schwarz hinterlegt, ähnliche Reste grau. Die grauen Balken geben die Bereiche mit Ähnlichkeit zu den SDR-Proteinen an (SDR-like). Das glycinreiche Motiv der putativen Nukleotidbindestelle und der konservierte Aspartatrest sind durch Sterne gekennzeichnet. Weitere konservierte Aminosäurereste sind mit Dreiecken markiert. Die vorhergesagte Sekundärstruktur der putativen Nukleotidbindestelle ist schematisch über der Sequenz angedeutet: schwarzer Balken: α -Helix, Zickzack: β -Strang

3.2 Das Protein HCF173 ist mit den Membranen des Chloroplasten assoziiert

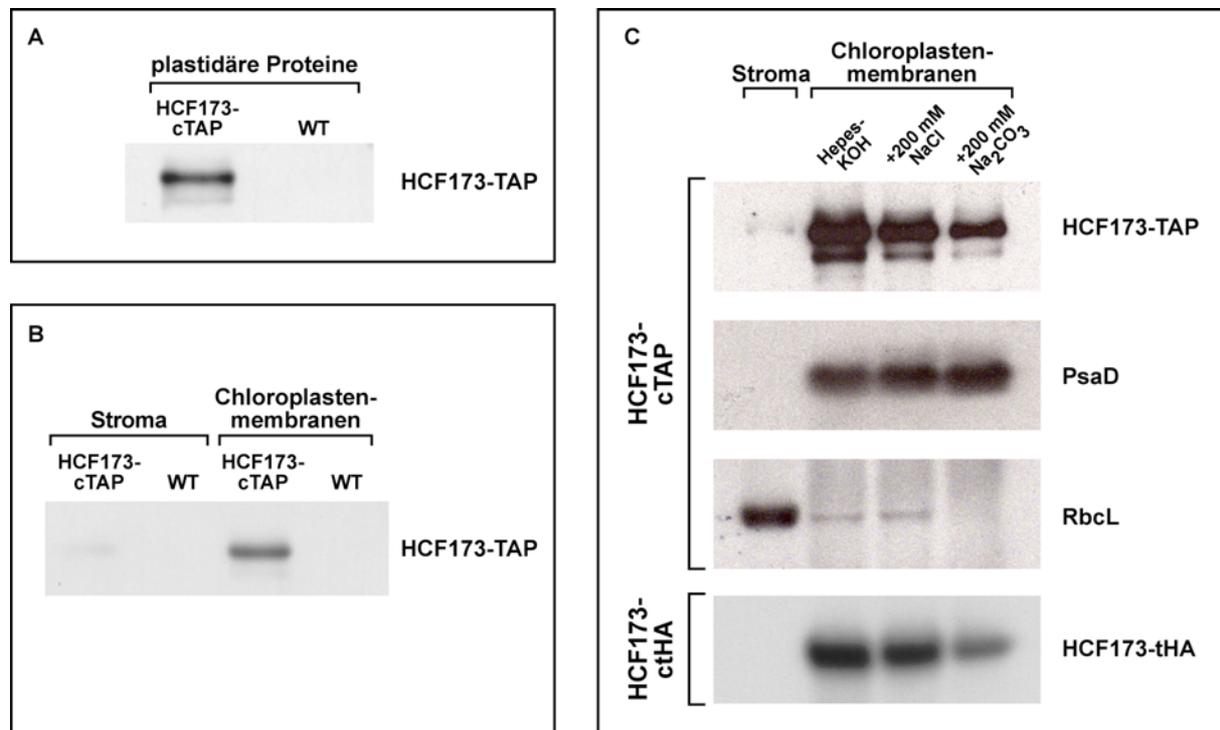


Abb. 20: Immunolokalisation von HCF173-Fusionsproteinen. (A) Plastidäre Lokalisation von HCF173-TAP. Chloroplasten vier Wochen alter Wildtyp- (WT) und HCF173-cTAP- Pflanzen wurden über Percollgradienten-Zentrifugation isoliert. Je 20 µg Protein wurden zur SDS-Gelelektrophorese und Gelblotanalyse eingesetzt. (B) Lokalisation von HCF173-TAP innerhalb des Chloroplasten. Nach Lyse der Chloroplasten wurden die plastidären Proteine durch Zentrifugation in Stroma- und Membranproteine getrennt. Zur Gelblotanalyse wurden je 20 µg Protein eingesetzt. (C) Analyse der Membranassoziation von HCF173-TAP bzw. HCF173-tHA. Intakte Chloroplasten aus HCF173-cTAP- und HCF173-ctHA-Pflanzen wurden lysiert. Die Membranen wurden mit 200 mM NaCl bzw. 200 mM Na₂CO₃ gewaschen. Proteinäquivalente entsprechend 10 µg Chlorophyll wurden zur SDS-Gelelektrophorese und Gelblotanalyse eingesetzt.

Die Analyse der Aminosäuresequenz von HCF173 sagte dem Protein eine Lokalisation im Chloroplasten voraus. Um diese Prognose zu bestätigen, wurden aus Wildtyp- und HCF173-cTAP-Pflanzen Chloroplasten isoliert und die Proteine der Organellen durch Immunoblotanalyse auf das Vorhandensein des HCF173-Fusionsproteins überprüft. Abbildung 20A legt zum einen dar, dass HCF173-TAP spezifisch nachgewiesen werden kann, und zum anderen, dass das Fusionsprotein und damit auch HCF173 tatsächlich im Chloroplasten lokalisiert ist. Durch Lyse der Chloroplasten und Zentrifugation wurden die Proteine in Stroma- und Membranproteine getrennt. Durch den immunologischen Nachweis des Fusionsproteins konnte gezeigt werden, dass HCF173-TAP hauptsächlich mit den Chloroplastenmembranen assoziiert ist (Abb. 20B). Nur geringe Mengen sind im Stroma zu finden. Durch Salzwassungen der Chloroplastenmembranen ließen sich Rückschlüsse auf Art und Stärke der Assoziation von HCF173 mit den Membranen ziehen. Während Natriumchlorid ionische Interaktionen löst, entfernt Natriumcarbonat durch seine alkalischen Eigenschaften periphere Membranproteine in einem pH-abhängigen Prozess (Fujiki et al., 1982). Integrale Membranproteine oder Proteine, die über starke hydrophobe

Wechselwirkungen mit der Membran verbunden sind, bleiben assoziiert (z.B. PsaD). Durch Waschung der Chloroplastenmembranen mit 200 mM NaCl wurde kaum HCF173-TAP von den Membranen gelöst (Abb. 20C). Dagegen konnte ein großer Teil des Proteins durch Behandlung der Membranen mit 200 mM Natriumcarbonat freigesetzt werden. Diese Ergebnisse legen nahe, dass es sich bei HCF173 um ein peripheres Membranprotein handelt. Um auszuschließen, dass die Membranassoziation durch das TAP-Etikett verursacht wurde, wurden die Salzwuschungen in einem unabhängigen Versuch mit Chloroplastenmembranen wiederholt, die aus Pflanzen der HCF173-ctHA-Komplementanten isoliert wurden. Dieses Experiment bestätigte das vorherige Ergebnis (Abb. 20C unten). HCF173-tHA ließ sich ebenfalls erst mit Natriumcarbonat zu einem Großteil von den Chloroplastenmembranen waschen. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Assoziation von HCF173 an die Membranen nicht von der C-terminalen Etikettierung vermittelt wird. Die berechneten Molekulargewichte der beiden Fusionsproteine HCF173-TAP und -tHA sollten mit plastidärer Transitsequenz 86,3 kDa und 69,3 kDa betragen. Die vorhergesagten reifen Proteine sollten Molekulargewichte von 77,3 kDa bzw. 60,3 kDa aufweisen. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung und anschließender Immunoblotanalyse konnte den Fusionsproteinen Größen von etwa 90 kDa bzw. 70 kDa zugewiesen werden (ohne Abbildung). Somit kann davon ausgegangen werden, dass die plastidären Transitpeptide nach dem Transport über die Chloroplastenhüllmembranen nicht entfernt werden.

3.3 Nachweis von HCF173 als Teil eines höhermolekularen Komplexes

3.3.1 Solubilisierung von HCF173 mit Digitonin

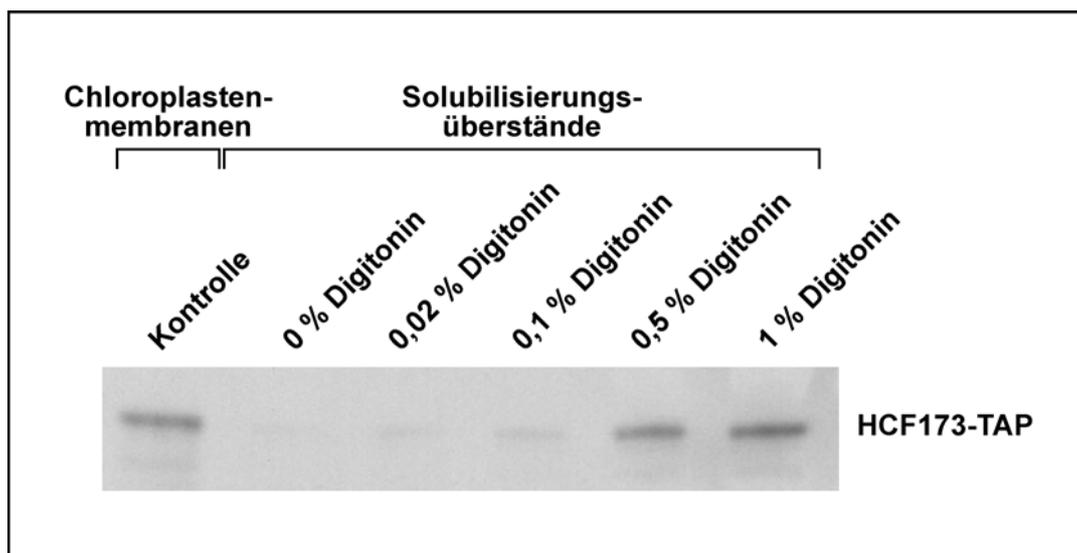


Abb. 21: Bestimmung der geeigneten Digitoninkonzentration zur Solubilisierung von HCF173-TAP. Chloroplastenmembranen von HCF173-cTAP-Pflanzen wurden mit den angegebenen Digitoninkonzentrationen solubilisiert. Die Chlorophyllkonzentration betrug 1 mg/ml. Nach der Zentrifugation wurden je 10 µl des Solubilisierungsüberstandes auf einem SDS-Gel aufgetrennt. Die Proteine wurden durch Elektrotransfer auf Nitrocellulose geblottet. Der Nachweis von HCF173-TAP erfolgte über ein Anti-Maus-Peroxidase-Konjugat aus Kaninchen.

Die Immunolokalisationsstudien hatten dargelegt, dass HCF173 fast vollständig mit den Membranen der Chloroplasten assoziiert ist. Um HCF173 als möglichen Teil eines Komplexes aufzureinigen, mussten das Protein und die putativen Interaktoren schonend solubilisiert werden. Hierzu bot sich das nichtionische Detergenz Digitonin an, das schon in früheren Versuchen zur Solubilisierung von Thylakoidmembranen verwendet wurde (van Wijk et al., 1996; Schuenemann et al., 1999; Satoh, 2003; Sane et al., 2005). Es gehört zu den Digitalisglykosiden und besitzt ein Steroidgerüst. Aus diesem Grund weist das Detergenz eher eine starre Struktur auf und solubilisiert hauptsächlich die Proteine der Stromathylakoide (Wessels, 1962; Anderson und Boardman, 1966). Da die Synthese von D1 zu Reparaturzwecken des Photosystem II hauptsächlich an diesen Thylakoiden stattfindet (Boschetti et al., 1990) und HCF173 aufgrund seiner zugeordneten Rolle bei der Expression von D1 möglicherweise ebenfalls mit diesen Membranen assoziiert ist, sollte Digitonin aufgrund seiner Eigenschaften für die Solubilisierung von HCF173 geeignet sein.

Um dies zu testen, wurden Chloroplastenmembranen aus Komplementanten mit dem TAP-Fusionsprotein isoliert und bei einer Chlorophyllkonzentration von 1 mg/ml mit verschiedenen konzentrierten Digitoninlösungen für 30 – 40 Minuten bei 4 °C auf einem Rotor inkubiert. Nach Sedimentation nicht solubilisierter Materialien wurden die Überstände durch Immunoblotanalyse auf die Anwesenheit von HCF173 getestet (Abb. 21). Es konnte dargelegt werden, dass Digitoninkonzentrationen von $\leq 0,1$ % im Versuchsansatz nicht ausreichen, um das HCF173-Fusionsprotein zu solubilisieren. Bei einer Konzentration von 0,5 % Digitonin war das Protein nach Inkubation mit dem Detergenz und Zentrifugation fast vollständig im Überstand zu finden. Die Verdopplung der Digitoninkonzentration im Versuchsansatz auf 1 % führte schließlich zur vollständigen Solubilisierung. Aufgrund dieses Ergebnisses konnte bestätigt werden, dass sich Digitonin als mildes Detergenz zur Solubilisierung von HCF173 eignet. Es wurde in nachfolgenden Studien zur Funktionsanalyse des HCF173-Proteins mit einer Konzentration von 1 % (w/v) bei einer Chlorophyllkonzentration von 1 mg/ml zur Solubilisierung eingesetzt.

3.3.2 Zentrifugation von solubilierten Membranproteinen des Chloroplasten im linearen Saccharose-Dichtegradienten

Die Zentrifugation im linearen Saccharosegradienten stellt eine etablierte Methode zur Trennung von detergenz-solubilierten Komplexen der Thylakoidmembran dar (Bassi und Simpson, 1987; van Wijk et al., 1996). Die Komplexe werden dabei nach dem Prinzip der Zonenzentrifugation ihrem Molekulargewicht entsprechend separiert.

Um festzustellen, ob das HCF173-Protein seine Funktion als Teil eines Komplexes ausübt, wurden Thylakoidmembranen aus HCF173-cTAP-Pflanzen isoliert und mit 1 % (w/v) Digitonin solubilisiert. Die Überstände des Solubilisierungsansatzes wurden nach der Zentrifugation ad 0,5 % (w/v) n-Dodecyl- β -D-maltosid versetzt und auf einen linearen Saccharosegradienten geschichtet. Nach beendeter Ultrazentrifugation wurde der Gradient in Fraktionen geerntet und die Proteine mit TCA gefällt. Durch Immunoblotanalyse mit spezifischen Antikörpern wurden die Fraktionen auf Anwesenheit verschiedener Untereinheiten der Thylakoidmembrankomplexe getestet. Die Identifizierung der Thylakoidmembrankomplexe wurde durch optischen Vergleich der Saccharosegradienten

und durch einen Vergleich der Proteinverteilung im Gradienten mit den Ergebnissen aus (Müller und Eichacker, 1999) vorgenommen.

So ließen sich in den stark grün gefärbten Fraktionen 5 und 6 die Trimere des LHC II vermuten, die eine ungefähre molekulare Masse von 130 kDa besitzen (Abb. 22). Aufgrund des Verteilungsmusters der Cyt f-Untereinheit wurde der Cytochrom b_6f -Komplex in den Fraktionen 5 bis 8 identifiziert. Das Verteilungsmaximum von Cytochrom f lag in Fraktion 7. Hierbei handelte es sich vermutlich um die aktive dimere Form des Komplexes, die eine ungefähre Masse von 250 kDa aufweist. In Fraktion 5 lag der Komplex eher als Pseudomonomer vor (\approx 90 kDa). Das PsaD-Protein des Photosystems I konnte hauptsächlich in Fraktion 9 identifiziert werden. Aufgrund der Größe und der starken grünen Färbung der Bande handelte es sich hier um den PSI-Kernkomplex mit gebundenem LHCI (\approx 540 kDa). Das D1 Protein wurde hauptsächlich in den Fraktionen 9 und 10 detektiert. An dieser Position bandiert aufgrund der Größe das Dimer des PSII-Kernkomplexes (\approx 620 kDa).

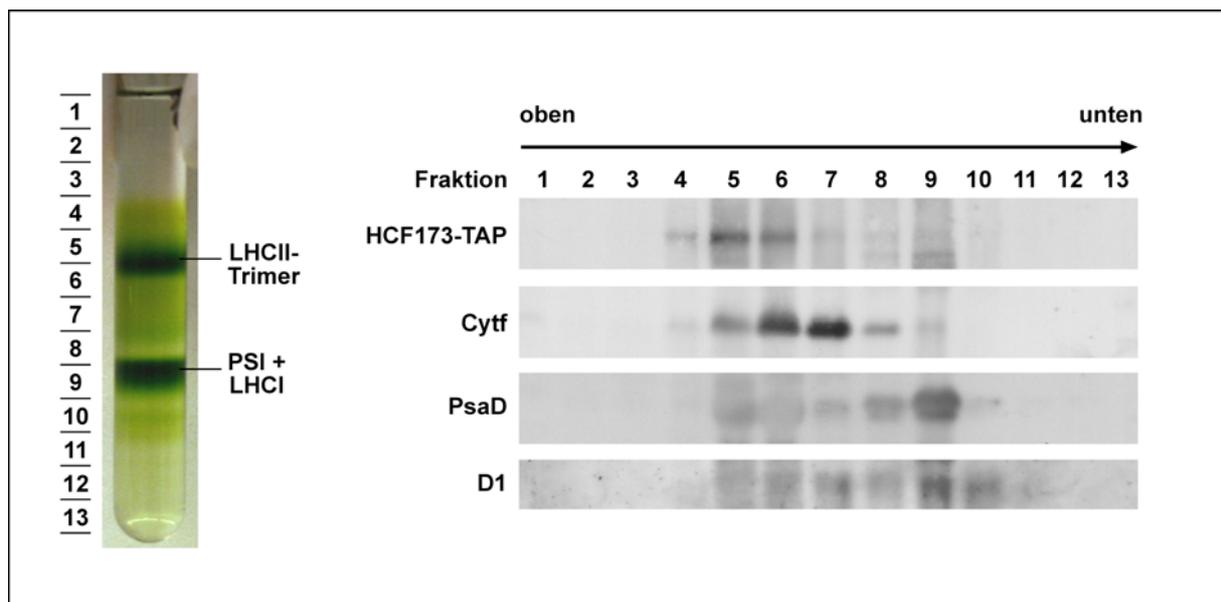


Abb. 22: Lokalisierung von HCF173-TAP im linearen Saccharosegradienten. Aus HCF173-cTAP-Pflanzen wurden Chloroplastenmembranen isoliert und mit 1 % (w/v) Digitonin solubilisiert. Nach Zentrifugation wurde der Überstand ad 0,5 % (w/v) mit n-Dodecyl- β -D-maltosid versetzt. 500 μ l der Suspension wurden auf einen 0,1 – 1 % (w/v) Saccharosegradienten geschichtet und die enthaltenen Proteinkomplexe durch Dichtegradientenzentrifugation voneinander getrennt. Der Gradient wurde in 1 ml-Fractionen geerntet. Die Proteine der Fraktionen wurden mit TCA gefällt, auf einem SDS-Gel aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran geblottet und mit entsprechenden Antikörpern detektiert.

Das Fusionsprotein HCF173-TAP verteilte sich im Gradienten in den Fraktionen 4 bis 8, wobei sich das Verteilungsmaximum in den Fraktionen 5 und 6 befand. Die Verteilung des Proteins bis in die Fraktion 8, die etwa einem Molekulargewicht von 300 – 400 kDa entsprach, deutete an, dass HCF173-TAP *in vivo* mit anderen Faktoren assoziiert vorliegt. Da die Gradienten mit einem Gradientenernter von unten gesammelt wurden, konnte eine Kontamination durch Verschleppung des Proteins in andere Fraktionen ausgeschlossen

werden. In Fraktion 5 wurde das Pseudomonomer des Cytochrom b_6f -Komplexes vermutet, das mit einem Molekulargewicht von ca. 90 kDa etwa dem des HCF173-TAP-Proteins entsprach. Somit lag die Vermutung nahe, dass HCF173-TAP in dieser Fraktion hauptsächlich als Monomer vorlag. Allerdings bandierten in der Fraktion 5 auch die LHCII-Trimere mit einer Größe von etwa 130 kDa. Somit konnte die Assoziation von HCF173-TAP mit weiteren Proteinen in dieser Fraktion jedoch nicht ausgeschlossen werden.

Zusammengefasst lässt sich aus den Ergebnissen dieses Versuches schließen, dass HCF173-TAP mit anderen Komponenten assoziiert ist. Über die Größe und Anzahl der möglichen Komplexe kann aufgrund des zu geringen Auflösungsvermögens der Saccharosegradienten-Zentrifugation keine Aussage getroffen werden.

3.3.3 Auftrennung von solubilisierten Membranproteinen über 2D-(Blue Native-/SDS-) Gelelektrophorese

Eine Alternative zur Auftrennung solubilisierter Thylakoidmembran-Komplexe stellt die Blue Native-Gelelektrophorese dar. Bei dieser Technik werden die Proteinkomplexe mit einem nicht-ionischen Detergenz solubilisiert und auf einem nativen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Durch Zusatz des anionischen Farbstoffes Coomassie zum Probenpuffer werden die Proteine negativ geladen. Da Coomassie keine denaturierende Wirkung besitzt, können die Komplexe analog zur SDS-Gelelektrophorese ihrem Molekulargewicht entsprechend aufgetrennt werden (Schägger et al., 1994). Die Blue Native-Elektrophorese bietet ein besseres Auflösungsvermögen als die Saccharosegradienten-Zentrifugation und bedarf zudem nur eines geringen Probenvolumens. In Kombination mit der SDS-Gelelektrophorese (2. Dimension) können zuvor nativ aufgetrennte Proteinkomplexe (1. Dimension) in ihre Untereinheiten aufgelöst werden und diese in Immunoblotanalysen nachgewiesen werden. Zum Nachweis putativer HCF173-Komplexe wurden Thylakoidmembranen von HCF173-cTAP- bzw. HCF173-ctHA-Pflanzen mit 1 % (w/v) Digitonin solubilisiert. Die Solubilisierungsüberstände wurden nach der Zentrifugation ad 0,5 % (w/v) mit n-Dodecyl- β -D-Maltosid versetzt und auf einem Blue-Native-Gel aufgetrennt. Analog wurde mit solubilierten Komplexen aus Wildtyp-Pflanzen verfahren. Die einzelnen Bahnen wurden auf SDS-Gele aufpolymerisiert und die Komplexe durch Elektrophorese in ihre Untereinheiten getrennt. In Immunoblot-Analysen wurden die Fusionsproteine detektiert. Abbildung 23 A zeigt, dass HCF173-TAP in verschiedenen großen Aggregaten detektiert werden kann. Der größte Anteil des Proteins wurde, bezogen auf die 1. Dimension, in einem Molekulargewichtsbereich von 130 – 150 kDa nachgewiesen. Fünf weitere Signale wurden in einem Bereich von 210 – 500 kDa nachgewiesen, ein sehr schwaches Signal war sogar bei über 669 kDa zu beobachten. Somit konnte die Vermutung bestätigt werden, dass HCF173 als Teil eines oder mehrerer höhermolekularer Komplexe vorliegt. Die Banden auf Höhe von 55 kDa (2. Dimension) wurden vermutlich durch Abbauprodukte von HCF173-TAP hervorgerufen. Die mit einem Sternchen markierte Bande wurde durch die hämassoziierte Peroxidaseaktivität des Cytochrom f während der ECL-Detektion verursacht (Lennartz et al., 2001).

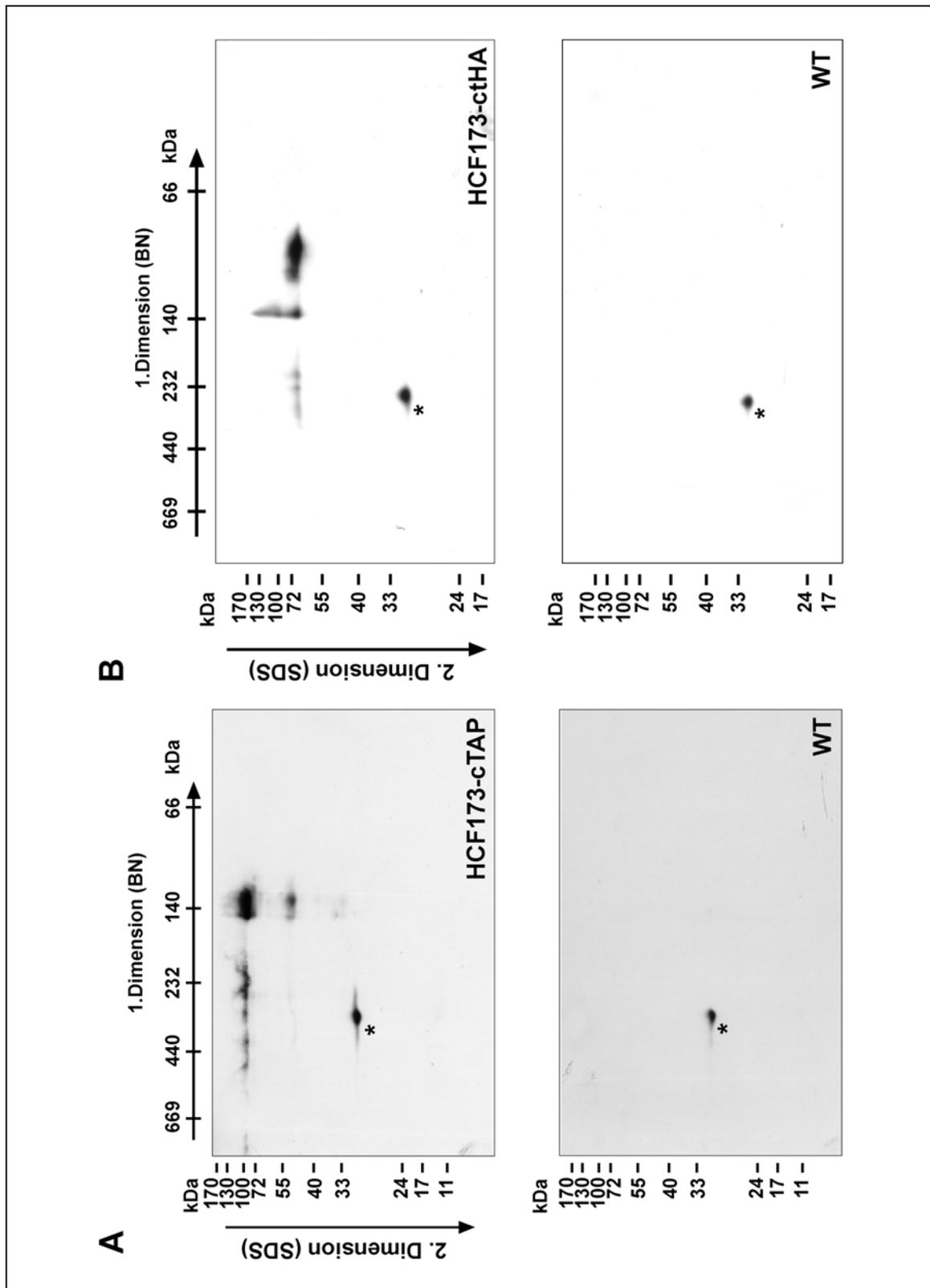


Abb. 23: Identifizierung von HCF173-Proteinkomplexen mittels 2D-(Blue Native-/SDS-) Gelelektrophorese. Thylakoidmembranen aus Wildtyp- (WT), HCF173-cTAP- und HCF173-ctHA-Pflanzen wurden mit 1 % (w/v) Digitonin solubilisiert. Nach Zentrifugation wurde der Solubilisierungsüberstand ad 0,5 % (w/v) n-Dodecyl- β -D-maltosid versetzt. Die im Überstand enthaltenen Proteinkomplexe wurden ihrem Molekulargewicht entsprechend durch Blue Native-Gelelektrophorese aufgetrennt (1. Dimension). Durch anschließende SDS-PAGE wurden die Komplexe in ihre Untereinheiten zergliedert (2. Dimension). Komplexe, die HCF173-TAP bzw. HCF173-tHA als Untereinheiten enthielten, wurden durch Gelblotanalyse identifiziert. Das durch einen Stern markierte Signal wurde durch die Peroxidaseaktivität von Cyt f während des Chemilumineszenznachweises hervorgerufen.

HCF173-tHA konnte ebenfalls in verschiedenen Aggregaten detektiert werden (Abb. 23B). Der größte Teil wurde im Bereich von ca. 100 – 110 kDa (1. Dimension) nachgewiesen. Weitere Signale wurden bei ca. 140, 200, 230 und 300 kDa detektiert. Die abnehmende Stärke der Signale zu den größeren Aggregaten spiegelt in beiden Versuchen möglicherweise den Zerfall eines großen HCF173-Komplexes in Teilkomplexe wieder. Dieser Zerfall könnte durch schwache Interaktionen zwischen den Interaktionspartnern verursacht werden, die während der Solubilisierung bereits aufgelöst wurden. Bisher konnte nicht geklärt werden, ob die starken Signale bei 130 kDa (HCF173-TAP; SDS-Gel: \approx 90 kDa) bzw. 100 kDa (HCF173-tHA; SDS-Gel: \approx 60 kDa) durch die Monomere der Fusionsproteine verursacht wurden oder ob die Proteine schon assoziiert mit einem Interaktionspartner vorlagen. Da allerdings die Expression der Fusionsproteine unter der Kontrolle des starken 35S-Promotors stand, ist es sehr wahrscheinlich, dass die starken Signale durch die Überexpression der Monomere zustande kamen und aufgrund mangelnder Interaktionspartner nicht zu einem Komplex assemblieren konnten. Möglicherweise spielt auch ein starker Zerfall des HCF173-Komplexes eine Rolle. Die Größenunterschiede könnten in der 1. Dimension durch Assoziation der Monomere mit Detergenz verursacht worden sein.

Diese Ergebnisse lassen zusammenfassend den Schluss zu, dass HCF173 Teil eines höhermolekularen Komplexes ist. Die Größe dieses Komplexes konnte nicht genau bestimmt werden, allerdings weist die Analyse mit solubilisierten Proteinen aus HCF173-cTAP-Pflanzen auf einen Komplex mit einem Molekulargewicht von über 669 kDa hin.

3.3.4 Biochemische Quervernetzung von HCF173-Fusionsproteinen

Durch Zentrifugation der Komplexe der Thylakoidmembran im linearen Saccharosegradienten und Auftrennung über 2D-(Blue Native-/SDS-) Gelelektrophorese konnte dargelegt werden, dass HCF173 in verschieden großen Komplexen detektiert werden konnte. Da spekuliert wurde, dass der eigentliche Komplex möglicherweise nicht stabil ist, wurde für spätere Affinitätschromatographische Aufreinigungen nach einer Möglichkeit gesucht, die Interaktionen zwischen den Komponenten der Komplexe zu stabilisieren. Ein geeignetes Mittel dazu stellen quervernetzende Agenzien dar, die die Interaktionen über kovalente Bindungen verknüpfen können. In dieser Arbeit wurden die zwei verschiedenen Quervernetzer DSP und DTSSP getestet. Beides sind homobifunktionelle Hydroxysuccimidester, die mit α -Aminogruppen an den N-Termini der Proteine und den ϵ -Aminogruppen der Lysinreste reagieren. Während DTSSP wasserlöslich ist, kann DSP nur in organischen Lösungsmitteln gelöst werden, kann dafür aber auch in Membransysteme eindringen. Beide Quervernetzer besitzen eine Disulfidgruppe im Zentrum ihrer Struktur, die es ermöglicht, die Quervernetzung wieder aufzulösen. Durch diese Eigenschaft wäre nach erfolgreicher Aufreinigung der HCF173-Komplexe die Trennung in die Untereinheiten zur massenspektrometrischen Identifikation möglich.

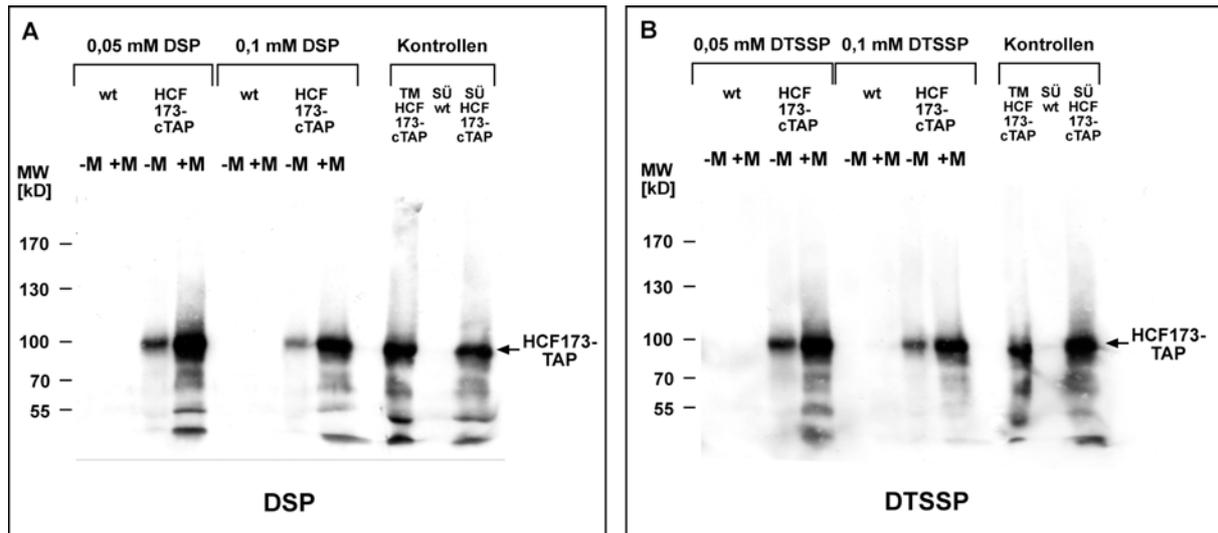


Abb. 24: Quervernetzung von HCF173-TAP mit Hilfe von DSP bzw. DTSSP. Chloroplastenmembranen aus Wildtyp- (WT) und HCF173-cTAP-Pflanzen wurden mit 1 % (w/v) Digitonin solubilisiert. Nach Zentrifugation wurde der Solubilisierungsüberstand mit den angegebenen Konzentrationen der quervernetzenden Agenzien DSP bzw. DTSSP inkubiert. Aliquots der Inkubationen wurden mit Probenpuffer ohne β-Mercaptoethanol (-M) bzw. mit β-Mercaptoethanol (+M) versetzt und über SDS-PAGE aufgetrennt. HCF173-TAP und mögliche HCF173-TAP enthaltende Komplexe wurden durch Immunoblotanalyse nachgewiesen. Als Kontrollen dienten Aliquots der Solubilisierungsüberstände (SÜ) und nichtsolubilisierter Thylakoidmembranen (TM).

Zur Durchführung der Quervernetzungsreaktion wurden Thylakoidmembranen aus HCF173-cTAP-Pflanzen isoliert und mit 1 % (w/v) Digitonin solubilisiert. Nichtsolubilisiertes Material wurde durch Zentrifugation sedimentiert und der Überstand mit verschiedenen Konzentrationen von Quervernetzern versetzt. Abbildungen 24A und B zeigen, dass die Menge an monomerem HCF173-TAP-Protein im Vergleich zur Kontrolle schon bei einem Einsatz von nur 0,05 mM DSP bzw. DTSSP geringer wurde. Bei Verdopplung der Quervernetzerkonzentrationen wurde dieser Effekt noch deutlicher. Allerdings konnten weder beim Einsatz von DSP noch bei der Verwendung von DTSSP Quervernetzungsprodukte detektiert werden. Dass jedoch Quervernetzung stattgefunden haben musste, zeigte sich durch die Behandlung der Reaktionsansätze mit dem reduzierenden Agens β-Mercaptoethanol. Die Quervernetzung konnte erfolgreich aufgelöst werden. Die Menge an monomerem HCF173-TAP war in diesen Proben mit den Kontrollen vergleichbar. Ein Grund für die fehlenden Quervernetzungsprodukte könnte möglicherweise dadurch gegeben sein, dass die entstandenen Produkte zu groß waren, um in das Gelsystem einzulaufen. Es ist allerdings wahrscheinlicher, dass das TAP-Proteinetikett, das zum Nachweis von HCF173 nötig ist, durch die Quervernetzung nicht mehr für den Antikörper zugänglich war. Zum einen könnten mit HCF173 interagierende Proteine das Etikett verdecken und zum anderen könnten die IgG-Bindedomänen durch eine mögliche Beteiligung an der Quervernetzung so verändert worden sein, dass sie während der Immunodetektion nicht mehr erkannt wurden. Da allein die Protein A-Komponente des Etiketts 14 der insgesamt 54 Lysin-Reste des Fusionsproteins beinhaltet, ist letztere Möglichkeit die wahrscheinlichste. Bei der Quervernetzung von HCF173-tHA sollten solche Effekte nicht auftreten, da das Epitopetikett keine Lysinreste aufweist. Die Banden, die unterhalb der HCF173-TAP-Monomere detektiert

wurden, wurden höchstwahrscheinlich durch distinkte Degradationsprodukte des Fusionsproteins hervorgerufen.

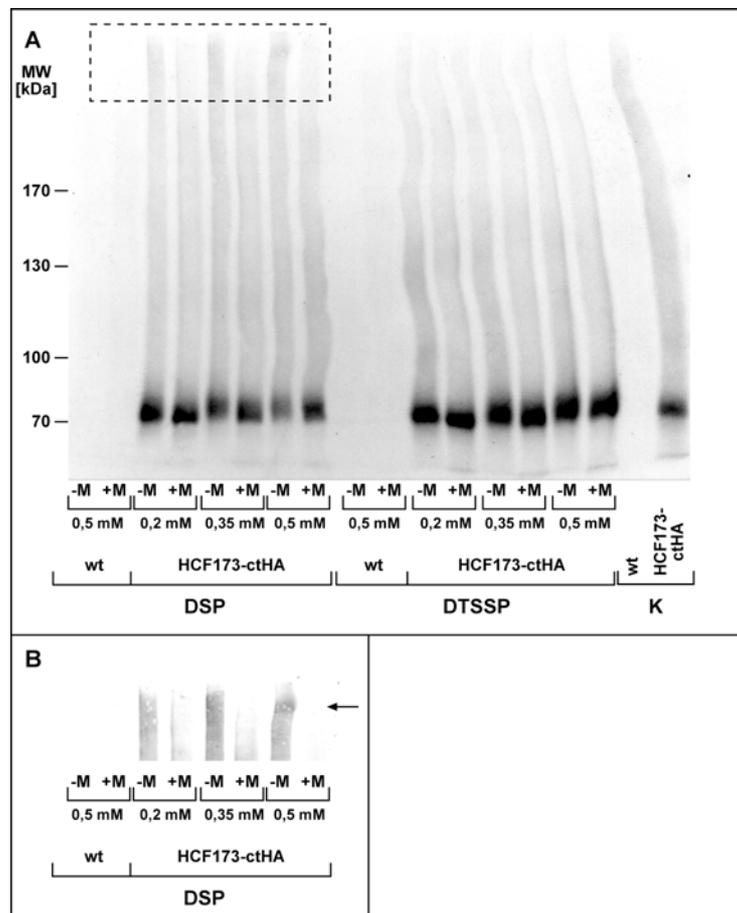


Abb. 25: Quervernetzung von HCF173-tHA mit Hilfe von DSP bzw. DTSSP. (A) Chloroplastenmembranen aus Wildtyp- (WT) und HCF173-ctHA-Pflanzen wurden mit 1 % (w/v) Digitonin solubilisiert. Nach Zentrifugation wurde der Solubilisierungsüberstand mit den angegebenen Konzentrationen der quervernetzenden Agenzien DSP bzw. DTSSP inkubiert. Aliquots der Inkubationen wurden mit Probenpuffer ohne β -Mercaptoethanol (-M) bzw. mit β -Mercaptoethanol (+M) versetzt und über SDS-PAGE aufgetrennt. HCF173-tHA und mögliche HCF173-tHA enthaltende Komplexe wurden durch Immunoblotanalyse nachgewiesen. Als Kontrolle (K) dienen Aliquots der Solubilisierungsüberstände. (B) Ausschnitt aus Abb. 25 A nach längerer Exposition.

Bei Wiederholung des Experimentes unter gleichen Versuchsbedingungen mit Extrakten, die das HCF173-tHA-Fusionsprotein enthielten, zeigte sich, dass die eingesetzten Konzentrationen an DSP bzw. DTSSP zu gering waren, um eine Quervernetzung herbeizuführen. Dies war vermutlich auf den geringeren Lysingehalt in HCF173-tHA im Vergleich zu HCF173-TAP zurückzuführen. Dies unterstützt die Theorie, dass das TAP-Etikett im vorausgegangenen Versuch an der Quervernetzung beteiligt war. Trotz einer Erhöhung der Quervernetzerkonzentration konnten beim Einsatz von DTSSP keine Quervernetzungsprodukte detektiert werden (Abb. 25) In den Versuchsansätzen mit DSP konnte ab einer Konzentration von 0,35 mM eine leichte Abnahme des HCF173-tHA-Monomers beobachtet werden. Im Größenbereich \gg 170 kDa wurde im Immunoblot eine diffuse Bande sichtbar. Diese Bande konnte nach der Behandlung eines Aliquots der quervernetzten Probe mit β -Mercaptoethanol nicht mehr nachgewiesen werden. Dies sprach für eine Anreicherung von HCF173-tHA im höhermolekularen Bereich und wies auf die

Fixierung eines HCF173-Komplexes hin, die durch den Einsatz von DSP hervorgerufen wurde. Allerdings ist nicht völlig auszuschließen, dass dieses Signal auf unspezifische sehr große Quervernetzungsprodukte, die in diesem Größenbereich akkumulieren, zurückzuführen ist. Aus diesem Grund wurde die Stabilisierung des HCF173-Komplexes mit DSP für affinitätschromatographische Zwecke ausgeschlossen. Zwischenprodukte von zum Beispiel etwa 140 kDa, wie sie in der Blue Native-Analyse auftraten, waren nicht zu beobachten. Warum keine Intermediate des HCF173-Komplexes beobachtet werden konnten, kann nur vermutet werden. Möglicherweise kann dies durch die Struktur und die Eigenschaft der verwendeten Quervernetzer erklärt werden. So könnte zum Beispiel nur ein großer Komplex die reagierenden Lysinreste in einem geeigneten Abstand voneinander aufweisen und die Proteine so miteinander verknüpfen, dass der Gesamtkomplex stabilisiert wird.

Zusammenfassend konnten über diesen Versuchsansatz keine neuen Erkenntnisse hinsichtlich des HCF173-Komplexes getroffen werden. Eine Stabilisierung des Komplexes für affinitätschromatographische Zwecke schien zumindest mit Hilfe dieser quervernetzenden Agenzien nicht möglich.

3.4 Affinitätschromatographie zur Identifizierung von Interaktoren des HCF173-Proteins

Anhand der Auftrennung von solubilisierten Komplexen der Chloroplastenmembranen im linearen Saccharose-Dichtegradienten und über Blue Native-Gelelektrophorese konnte nachgewiesen werden, dass HCF173 mit anderen Faktoren assoziiert vorliegt und somit Bestandteil mindestens eines höhermolekularen Komplexes ist. Um HCF173 als Teil eines Komplexes mit seinen Interaktoren aufzureinigen zu können, wurde der affinitätschromatographische Ansatz gewählt. Hierfür standen die zwei Komplementantennlinien HCF173-cTAP und HCF173-ctHA zur Verfügung. Die Proteinetiketten sollten die Aufreinigung der Fusionsproteine und ihrer putativen Interaktoren über verschiedene Säulenmatrices erlauben. Das Fusionsprotein HCF173-TAP sollte aufgrund seines zweiseitigen Proteinetiketts (Abb.8, II.12.17) an eine IgG-gekoppelte oder eine Calmodulin-gekoppelte Säule binden können. Für die Aufreinigung von HCF173-tHA wurde eine Säule verwendet, an die ein monoklonaler Antikörper gebunden war, der spezifisch das HA-Peptid als sein Antigen erkennt.

3.4.1 IgG-/Calmodulin-Affinitätschromatographie

In einem ersten Versuch zur Aufreinigung des Fusionsproteins HCF173-TAP und seinen möglichen Interaktoren sollte zunächst getestet werden, ob das Protein unter den gewählten Versuchsbedingungen über den IgG-bindenden Teil seines Proteinetiketts an eine IgG-Matrix gebunden und wieder eluiert werden kann. Zu diesem Zweck wurden solubilisierete Proteine der Thylakoidmembranen von HCF173-cTAP-Pflanzen mit IgG-Sepharose inkubiert. Zur Bestimmung der besten Elutionsbedingungen wurden vier verschiedene Puffer ausgetestet. Abb. 26A zeigt deutlich, dass die Aufreinigung des Fusionsproteins

grundsätzlich funktioniert. Die Menge an eluiertem HCF173-TAP variiert allerdings sehr stark. So kann mit Hilfe von 8 M Harnstoff kaum Protein von der Säule entfernt werden. Bei Verwendung von Glycin wird das Fusionsprotein zwar gut von der Säule eluiert, jedoch scheint HCF173-TAP unter den sauren Bedingungen nicht stabil zu sein und das etwa 20,5 kDa große TAP-Etikett wird abgespalten. Die besten Ergebnisse ließen sich durch Elution mit dem chaotropen Salz Natriumthiocyanat und dem Detergenz SDS erzielen. Aus diesem Grund wurden diese beiden Elutionsmittel in einem präparativen Affinitätschromatischen Ansatz eingesetzt. Bei der Analyse der Eluate auf einem mit Coomassie gefärbten Gel (Abb. 26B) zeigte sich, dass bei den hier gewählten Versuchsbedingungen viele Proteine unspezifisch an das Säulenmaterial binden können. Dieses Problem hätte über Optimierung der Versuchsbedingungen wahrscheinlich behoben oder zumindest verbessert werden können. Allerdings zeigte sich auch, dass die verwendete IgG-Sepharose nicht stabil war und die gekoppelten Immunglobuline sich von der Matrix lösten. Mit HCF173-TAP möglicherweise interagierende Proteine mit einem Molekulargewicht von etwa 25 und 50 kDa könnten nicht identifiziert werden.

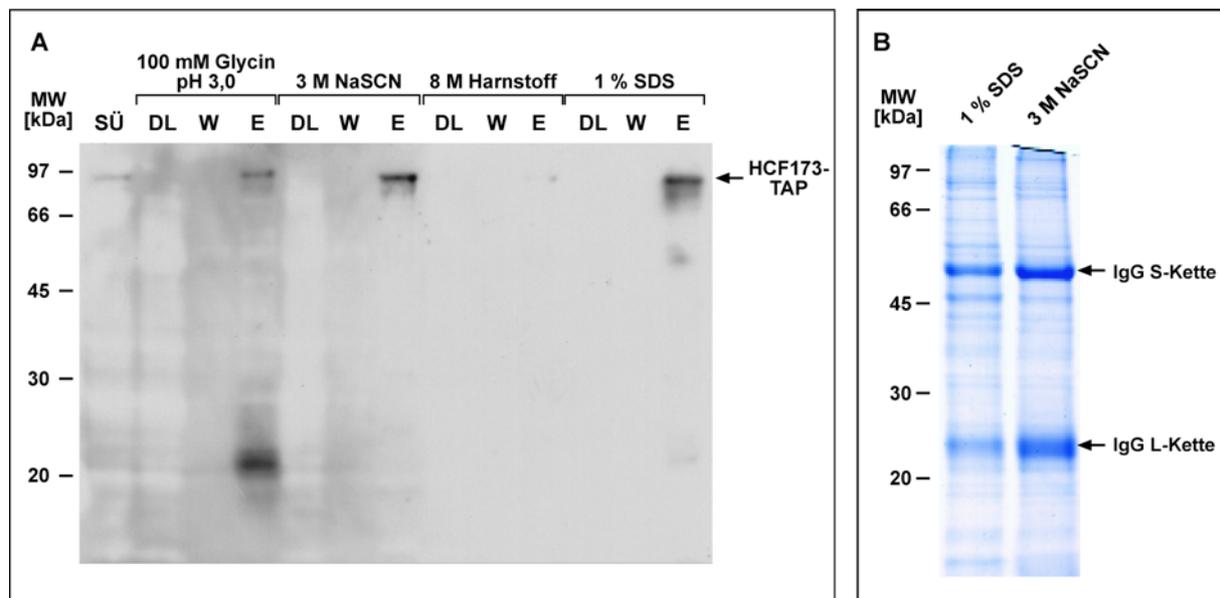


Abb. 26: Ermittlung geeigneter Elutionsbedingungen zur Aufreinigung des Fusionsproteins HCF173-TAP und möglicher Interaktionspartner mittels IgG-Affinitätschromatographie. (A) Chloroplastenmembranen von HCF173-cTAP-Pflanzen wurden wie unter Material und Methoden beschrieben mit Digitonin solubilisiert. In vier verschiedenen Ansätzen wurden 200 μ l Bettvolumen IgG-Sepharose mit 2,5 mg Chlorophylläquivalent des Solubilisierungsüberstandes inkubiert und anschließend gewaschen. Eluiert wurde mit Glycin, Natriumthiocyanat (NaSCN), Harnstoff bzw. SDS. Je 20 μ g Chlorophylläquivalent des Durchlaufs (DL), der Waschung (W) bzw. 500 μ g Chlorophylläquivalent der Elution wurden mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und auf Nitrocellulose transferiert. 20 μ g Chlorophylläquivalent des Solubilisierungsüberstandes (SÜ) dienten als Kontrolle. HCF173-TAP wurde mit Hilfe eines sekundären Antikörpers aus Kaninchen immunodetektiert. (B) Coomassie gefärbtes SDS-Gel. Es wurden je 2 μ g Chlorophylläquivalent der Elutionen mit SDS bzw. Natriumthiocyanat mittels Elektrophorese aufgetrennt und mit Coomassie-Blau gefärbt.

Um die geschilderten Probleme zu umgehen, sollte HCF173-TAP mit seinen putativen Interaktoren in einer zweifachen Affinitätschromatographie über IgG-Sepharose und eine Calmodulinmatrix aufgereinigt werden. Da hierfür eine Elution mit SDS und Natriumthiocyanat aufgrund der denaturierenden und chaotropen Eigenschaften der Agenzien ausgeschlossen war, wurde zu diesem Zweck zunächst getestet, ob die Elution

des Fusionsproteins mit Hilfe von TEV-Protease über die TEV-Protease-Schnittstelle im C-terminalen Proteinetikett möglich ist. Die Affinitätschromatographie wurde mit solubilisierten Proteinen der Thylakoidmembran von Wildtyp- und HCF173-cTAP-Pflanzen durchgeführt. Nach Entfernen des Protein A-Teil des Etiketts durch die Protease sollte das Fusionsprotein nach der Elution ein Molekulargewicht von etwa 71 kDa aufweisen. Abbildung 27A legt dar, dass kein Protein von solcher Größe aufgereinigt werden konnte. Lediglich die Banden der IgG-Ketten und der TEV-Protease waren nach der Auftrennung der eluierten Proteine nachweisbar. Der immunologische Nachweis des Fusionsproteins im Westernblot war nach Abspalten des Protein A-Teils nicht mehr möglich, da kein geeigneter Antikörper zur Verfügung stand. Da gezeigt werden konnte, dass das HCF173-TAP an die IgG-Matrix binden konnte, musste davon ausgegangen werden, dass die Elution mit Hilfe der TEV-Protease unter den gewählten Versuchsbedingungen nicht gelang und somit auch für eine Aufreinigung des Fusionsproteins über eine zweifache Affinitätschromatographie nicht genutzt werden konnte.

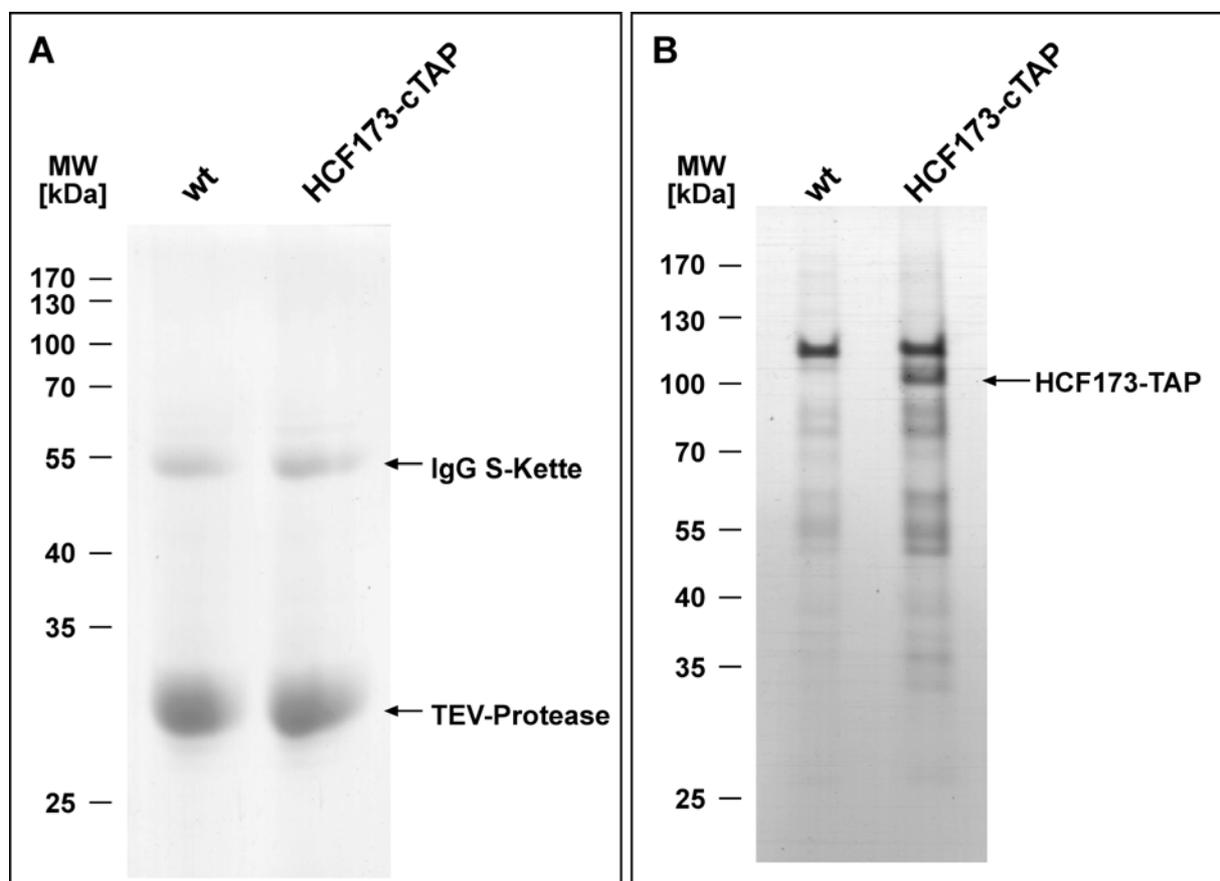


Abb. 27: Affinitätschromatographie von HCF173-TAP mit Hilfe von IgG-Sepharose und TEV-Protease bzw. einer Calmodulin-Matrix. Chloroplastenmembranen aus Wildtyp- (wt) und HCF173-cTAP-Pflanzen wurden mit 1 % (w/v) Digitonin solubilisiert. Nach Zentrifugation wurden die Solubilisierungsüberstände ad 0,5 % (w/v) mit n-Dodecyl- β -D-maltosid versetzt und zur Affinitätschromatographie eingesetzt. (A) Affinitätschromatographie mit Hilfe von IgG-Sepharose und TEV-Protease. Die Solubilisierungsüberstände wurden mit IgG-Sepharose inkubiert. Nach ausgiebigem Waschen wurden gebundene Proteine durch Inkubation mit TEV-Protease eluiert. (B) Affinitätschromatographie mit Hilfe einer Calmodulin-Matrix. Die Solubilisierungsüberstände wurden in Gegenwart von Calcium mit der Calmodulin-Matrix inkubiert. Nach ausgiebigem Waschen wurden gebundene Proteine durch EGTA eluiert.

Als letzte Möglichkeit zur Aufreinigung der Komponenten eines möglichen HCF173-TAP-Komplexes stand die einfache Affinitätschromatographie über eine Calmodulinmatrix zur Verfügung. Hierzu wurden solubilisierete Membranproteine aus Wildtyp- und HCF173-cTAP-Pflanzen in Gegenwart von Calcium mit der Matrix inkubiert. Die Säulen wurden ausgiebig gewaschen und die gebundenen Proteine mit EGTA eluiert. Die Elution mit EGTA beruhte auf der Komplexbildung des Calciums, das zur Bindung der Calmodulin-Bindedomäne an Calmodulin nötig war. Abbildung 27B zeigt, dass neben vielen anderen eluierten Proteinen, die sowohl in der Wildtyp- als auch in der HCF173-cTAP-Aufreinigung zu finden waren, ein Protein mit einem apparenten Molekulargewicht von etwa 100 kDa aufgereinigt werden konnte. Dieses Protein wurde über Massenspektrometrie als das Fusionsprotein HCF173-TAP identifiziert. Somit ist die Aufreinigung des Fusionsproteins prinzipiell möglich. Allerdings wurde die Identifizierung mit HCF173 interagierender Faktoren durch die vielen co-eluierten Proteine erschwert. Die Bindung dieser Proteine könnte sowohl unspezifischer als auch spezifischer Natur sein, da in *Arabidopsis thaliana* viele Proteine existieren, die eine Calmodulin-Bindedomäne besitzen.

Zusammenfassend war zwar die Isolierung des Fusionsproteins HCF173-TAP über das C-terminale Etikett möglich, die Aufreinigung jedoch nicht sauber genug, um mögliche Komponenten des über Saccharosegradienten-Zentrifugation und Blue Native-Gelelektrophorese nachgewiesenen HCF173-Komplexes zu identifizieren.

3.4.2 Anti-HA-Affinitätschromatographie

Als alternative Möglichkeit zur Identifizierung putativer Interaktoren von HCF173 bot sich die zweite Komplementationslinie HCF173-ctHA an, die ein HCF173-Protein mit einem C-terminalen Triple-HA-Epitop exprimiert. Zu diesem Zweck wurden solubilisierete Membranproteine aus HCF173-tHA-Komplementanten mit einer Sepharosematrix, an die hochaffine HA-Antikörper gekoppelt waren, inkubiert. Nach ausgiebigen Waschungen wurde gebundenes HCF173-tHA mit seinen putativen Interaktoren kompetitiv mit HA-Peptid eluiert. Als Kontrolle diente die Inkubation von Anti-HA-Sepharose mit solubilisierten Membranproteinen des Wildtyps. Die eluierten Proteine wurden mit TCA gefällt, über SDS-Elektrophorese aufgetrennt und mit Silber oder Coomassie-Blau gefärbt (Abb. 28A/B). Verschiedene Banden mit einem apparenten Molekulargewicht von 65-70 kDa wurden in allen Bahnen des Gels angefärbt, auch in denen, die nur Probenpuffer enthielten (Bahn x). Somit sind diese Banden auf eine unspezifische Färbung des Gels zurückzuführen. Allerdings konnten auch zwei Proteinbanden nachgewiesen werden, die spezifisch für die Affinitätschromatographie mit Extrakten aus HCF173-ctHA-Pflanzen waren. Diese wiesen apparente Molekulargewichte von ca. 70 und 40 kDa auf. Zur massenspektrometrischen Identifizierung dieser Proteine wurden die Eluate dreier unabhängiger Chromatographien vereinigt, elektrophoretisch aufgetrennt, mit Coomassie gefärbt und die Proteinbanden ausgeschnitten. Die massenspektrometrische Bestimmung wurde im BMFZ (Biologisch-Medizinisches Forschungszentrum, Düsseldorf) durchgeführt.

Das abundanteste Protein von ca. 70 kDa konnte als das Fusionsprotein HCF173-tHA identifiziert werden. Somit konnte gezeigt werden, dass die affinitätschromatographische Aufreinigung des epitopmarkierten HCF173-Proteins möglich ist. Das 40 kDa Protein wurde

als Produkt des Gens At3g23700 (Accession AAM98102) identifiziert. Aufgrund seiner Interaktion mit HCF173 wurde es mit AtHIP1 (*Arabidopsis thaliana* HCF173 interacting protein) bezeichnet. Das Protein besitzt eine vorhergesagte molekulare Masse von 42,7 kDa und setzt sich aus 392 Aminosäuren zusammen.

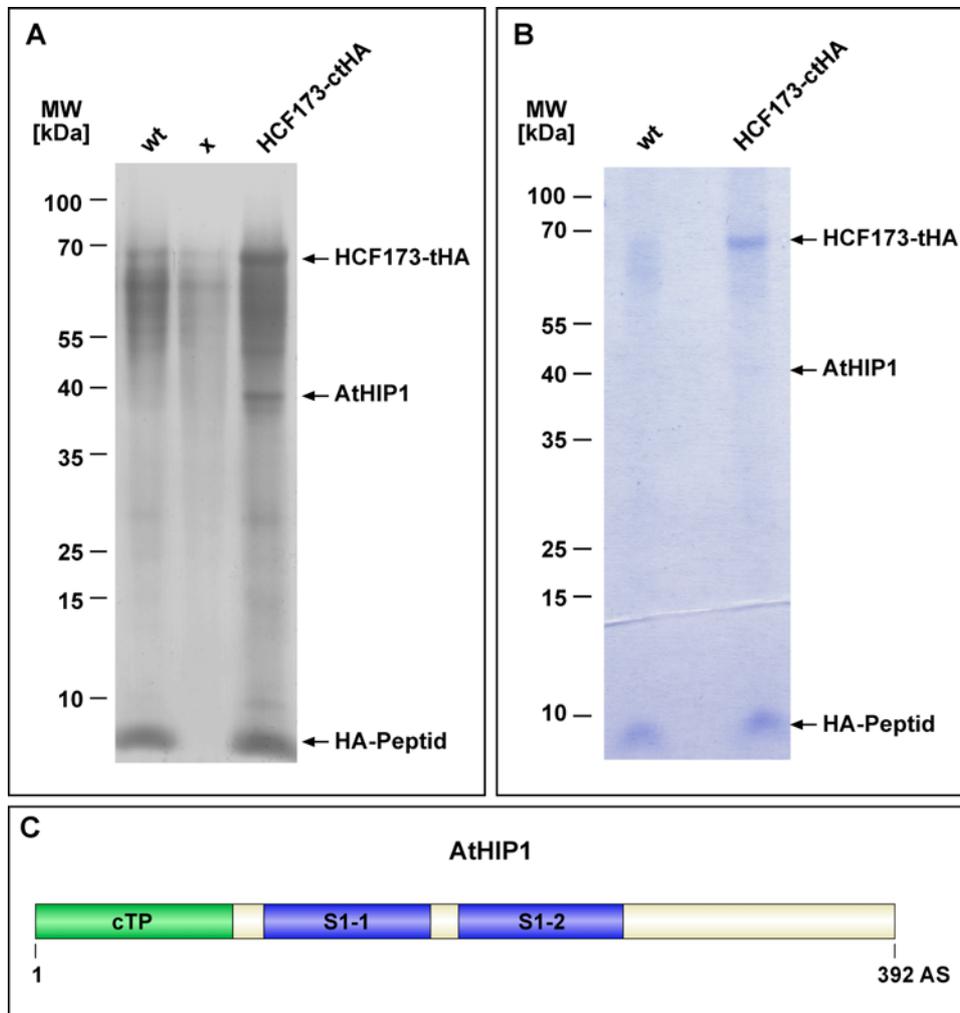


Abb. 28: Affinitätschromatographie mit Anti-HA-Sepharose. (A) Aus 15 g Blattmaterial von Wildtyp- bzw. HCF173-ctHA-Pflanzen wurden Thylakoidmembranen isoliert und mit 1 % (w/v) Digitonin solubilisiert. Nach Zugabe von n-Dodecyl- β -D-maltosid ad 0,5 % (w/v) wurden die erhaltenen Solubilisierungsüberstände mit Anti-HA-Sepharose inkubiert. An die Matrix gebundene Komponenten wurden mit HA-Peptid kompetitiv eluiert und auf einem 8 – 16,5 %igem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die für HCF173-ctHA spezifisch eluierten Komponenten HCF173-tHA und AtHIP1 wurden massenspektrometrisch bestimmt. (B) Wiederholung des Versuchs; Coomassie gefärbtes Gel. (C) Proteinstruktur von AtHIP1. Das Protein AtHIP1 ist 392 Aminosäuren lang. Es besitzt im N-Terminus ein vorhergesagtes Chloroplastentransitpeptid (cTP). Das reife Protein weist zwei S1-RNA-Bindedomänen auf.

Datenbankrecherchen attestieren AtHIP1 eine Chloroplastentransitsequenz im N-Terminus des Proteins. Dies ist sinnvoll, da HCF173 und sein Interaktor im gleichen Kompartiment aktiv sein sollten und für die Affinitätschromatographie solubilisierte Proteine der Chloroplastenmembranen verwendet wurden. Die Interaktion von HCF173-ctHA und AtHIP1 beruhte also nicht auf einer Kontamination des Versuchsansatzes mit Proteinen aus anderen Zellkompartimenten. Die weitere Datenbankanalyse deckte zwei S1-Motive in der

Primärsequenz von AtHIP1 auf (S1-1: Aminosäuren 105-182; S1-2: Aminosäuren 194-270). S1-Motive besitzen die Fähigkeit, RNA zu binden und wurden zum ersten Mal in der S1-Untereinheit der kleinen Untereinheit des *E. coli* Ribosoms gefunden und erhielten so ihren Namen (Subramanian, 1983). Die Aufreinigung von AtHIP1 als Interaktor von HCF173 und als möglichem RNA-bindendem Protein bekräftigt die Theorie, dass HCF173 eine Rolle im RNA-Metabolismus des Chloroplasten spielt.

3.4.3 Nachweis plastidärer Transkripte in affinitätschromatographisch aufgereinigten Eluaten

Die Erkenntnis, dass HCF173 mit einem eventuell RNA-bindendem Protein interagiert, deutete auf die Assoziation des HCF173-Komplexes mit RNA hin. Um diese Interaktion nachzuweisen, wurde die Affinitätschromatographie analog zum ersten Versuch durchgeführt. Die Eluate von aufgereinigten HCF173-ctHA- und Wildtypextrakten wurden durch Phenol-/ Chloroform-Extraktion aufgereinigt und die Nukleinsäuren mit tRNA aus Hefe als Fällungshilfe präzipitiert. Die gefällten Nukleinsäuren wurden zur Entfernung möglicher DNA-Kontaminationen einer DNase I-Behandlung unterzogen. Die RNA-Stränge wurden mit Hilfe von spezifischen Oligonukleotiden durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben und schließlich über PCR vervielfältigt. Es wurden Primer für die plastidären Gene *PsaC*, *PsbA*, *PsbB*, *PsbE*, *PsbH*, *PetB*, *AtpF* und *RbcL* benutzt. In Vorversuchen konnten die plastidären Transkripte sowohl im HCF173-ctHA- als auch im Wildtyp-Eluat nachgewiesen werden (ohne Abbildung). Dies bedeutete, dass die Anti-HA-Sepharose unspezifisch RNA binden kann. Um trotzdem mögliche Unterschiede in den Mengen der jeweiligen Transkripte in den Eluaten zu bestimmen, wurde die PCR-Analyse semiquantitativ ausgewertet. Dazu wurden die relativen Transkriptmengen des HCF173-ctHA-Eluats zu den relativen Transkriptmengen des Wildtyp-Eluats ins Verhältnis gesetzt. Um die semiquantitative Auswertung zu ermöglichen, wurden die relativen Transkriptmengen zu einem Zeitpunkt bestimmt, zu dem sich die PCR-Reaktionen in der exponentiellen Phase befanden. Die Ergebnisse dreier unabhängiger Versuche sind in Abbildung 29 dargestellt. Zwar schwankten die berechneten Verhältnisse der eluierten Transkripte teils recht deutlich, dennoch zeigten alle drei Experimente übereinstimmend eine stark erhöhte Menge des *PsbA*-Transkriptes in den Eluaten der Extrakte aus HCF173-ctHA-Pflanzen. In Experiment 1 betrug das Verhältnis der eluierten *PsbA*-Transkriptmengen 18,2 und war somit um den Faktor 2,4 höher als alle übrigen berechneten Verhältnisse. In Experiment 2 und 3 wurde dieser Unterschied noch wesentlich deutlicher. Hier waren die Verhältnisse der *PsbA*-Transkriptmengen 6,2 bzw. 4 mal höher als die restlichen Verhältnisse. Die Anreicherung der *PsbA*-RNA war nicht auf einen erhöhten *PsbA*-Transkriptspiegel in den HCF173-ctHA-Pflanzen zurückzuführen, da dieser mit dem des Wildtyps vergleichbar war (Abb. 17B). Somit zeigten diese Ergebnisse auf, dass speziell die *PsbA*-RNA durch die spezifische Interaktion mit dem HCF173-Komplex in den Eluaten der HCF173-ctHA-Extrakte angereichert wurde.

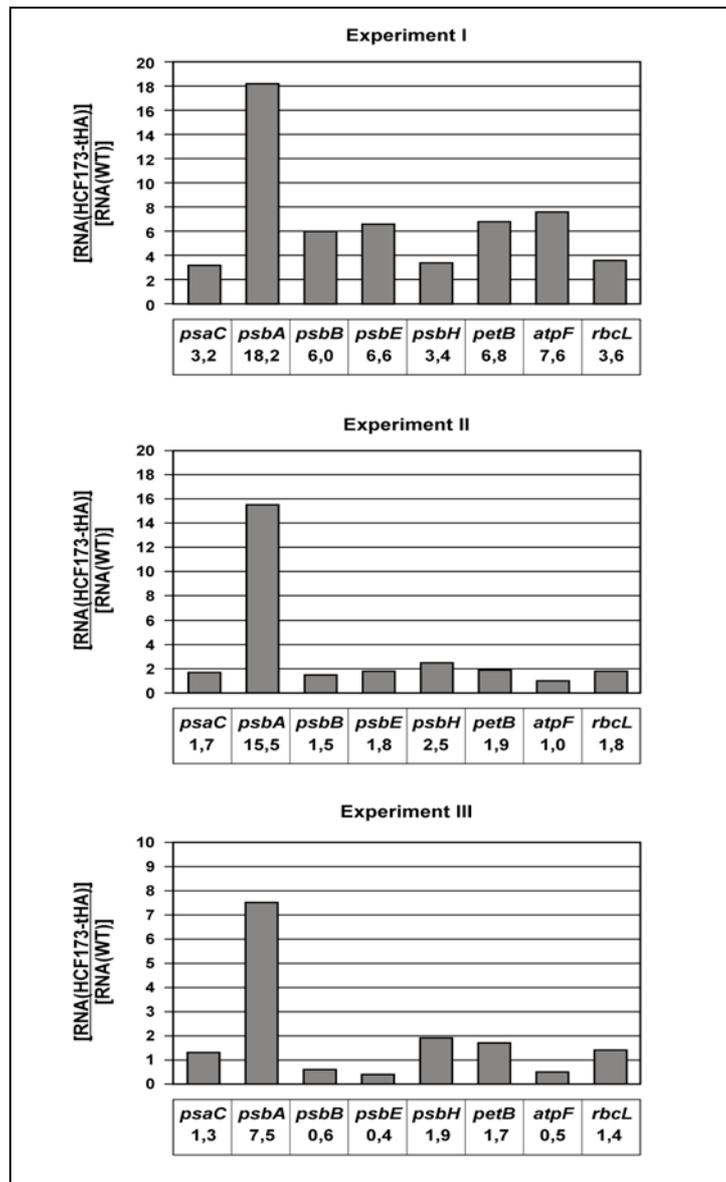


Abb. 29: Verhältnisse von aus HCF173-ctHA Extrakten aufgereinigten plastidären Transkripten zu aus Wildtyp-Extrakten aufgereinigten plastidären Transkripten. Anti-HA-Affinitätschromatographie wurde mit Solubilisierungsüberständen von Wildtyp- und HCF173-ctHA-Pflanzen durchgeführt. Aus den gewonnenen Eluaten wurde RNA isoliert. Relative Mengen verschiedener plastidärer Transkripte wurden durch reverse Transkription, anschließender PCR, Southern-Blot Analyse und Phosphoimaging bestimmt und zueinander ins Verhältnis gesetzt.

3.5 Expression des *HCF173*-Gens während der Chloroplastenbiogenese im Keimling

Die Mutante *hcf173* weist schwere Defekte in der Biogenese des Photosystems II auf, die auf mangelnde Synthese des D1-Proteins des Reaktionszentrums zurückgehen. Aufgrund des starken Phänotyps der Mutante wird vermutet, dass hauptsächlich die Reparatursynthese von D1 betroffen ist. Um herauszufinden, ob HCF173 auch für die *de novo* Synthese des Proteins benötigt wird, wurde die Expression des Gens in etiolierten und belichteten Keimlingen bestimmt. Da für HCF173 kein Antikörper existiert und die Expression

der Fusionsproteine in den komplementierten Pflanzenlinien unter Kontrolle des starken 35S-Promotors des Cauliflower-Mosaic-Virus stand, konnte die Expression von *HCF173* nur auf Ebene der RNA untersucht werden. *Arabidopsis thaliana*-Keimlinge wurden über einen Zeitraum von 5 Tagen etioliert angezogen und dann ins Licht transferiert. Nach 1, 2, 4, 8 und 24 h im Licht wurden die Keimlinge geerntet und ihre RNA isoliert. Als Dunkel-Kontrolle (0 h Belichtung) dienten Keimlinge, die unter Grünlicht geerntet wurden. Die isolierten Transkripte wurden durch Analyse über Real-Time-PCR auf die relativen *HCF173*-Transkriptmengen überprüft. Dazu wurden zunächst gleiche Mengen RNA durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben und dann in einem Real-Time-PCR-Gerät mit Hilfe von spezifischen Primern vervielfältigt. Als Kontrolle diente die Amplifikation der mRNA des Actins als Hauswirtschaftsgen. Dieses Transkript sollte also in allen Proben gleich häufig vorhanden sein. Die Menge an gebildeten PCR-Produkten konnte durch Messung der Fluoreszenz des SYBR-Green Markers, die bei Interkalation in doppelsträngige DNA-Bereiche erfolgt, verfolgt werden. Bei Überschreitung eines bestimmten Fluoreszenzwertes (Schwellenwert), wurden die sogenannten C_T -Werte bestimmt. Diese gaben den PCR-Zyklus an, bei dem der Fluoreszenz-Schwellenwert überschritten wurde. Im Vergleich zweier Proben deutete also ein niedrigerer C_T -Wert auf einen höheren Transkriptgehalt in der Probe hin.

Die Ergebnisse der Real-Time-PCR-Reaktionen sind in Abb. 30A und B wiedergegeben. Sie deuten darauf hin, dass *HCF173* bereits im etiolierten Keimling exprimiert wird, da PCR-Produkt in den Proben der Dunkelkontrolle nachgewiesen werden konnte. Des Weiteren zeigte sich, dass der Spiegel der *HCF173*-mRNA durch Licht deutlich erhöht wurde. Nach mathematischer Auswertung der für *HCF173* und Actin erhaltenen C_T -Werte konnte der Anstieg des *HCF173*-RNA-Pegels vor allem in den ersten zwei Stunden der Belichtungsphase beobachtet werden (Abb. 30C). Die Differenz der C_T -Werte der Proben nach 2 h-Belichtung und der Dunkelproben betrug etwa 4 Zyklen. Somit war in den 2 h belichteten Proben etwa $2^4 = 16$ mal mehr *HCF173*-Transkript enthalten als in den Dunkelproben. Mit diesem Versuch konnte also gezeigt werden, dass *HCF173* zumindest auf RNA-Ebene schon sehr früh in der Entwicklungsphase des Chloroplasten exprimiert wird und seine Akkumulation in dieser Phase durch Licht deutlich gefördert wird. Dies unterstreicht die wichtige Rolle von *HCF173* für die Biogenese des PS II. *HCF173* scheint somit nicht nur für die Erhaltung des PSII unabdingbar zu sein, es trägt anscheinend auch zur *de novo* Biogenese des Photosystems bei.

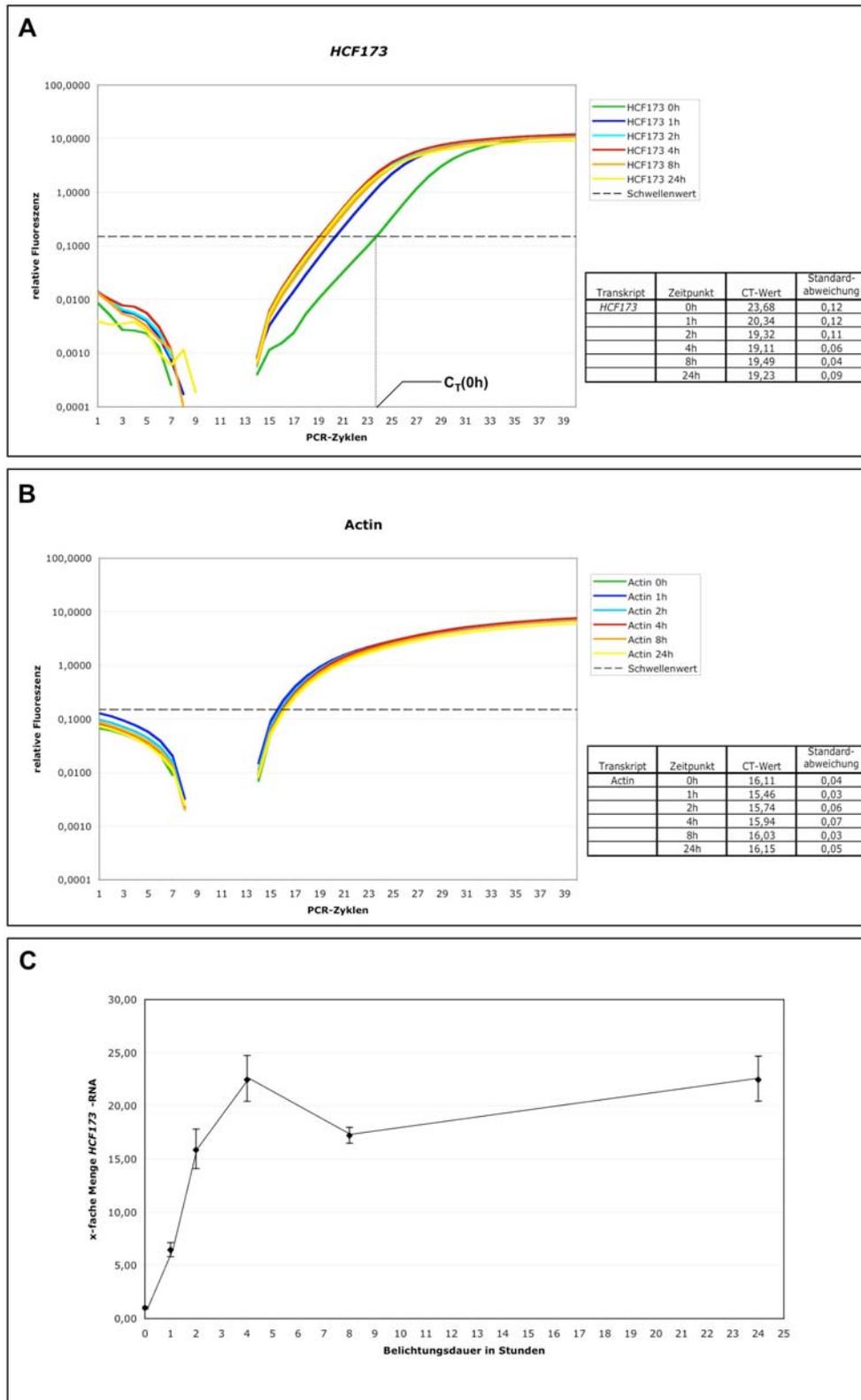


Abb. 30: Expression von *HCF173* während der lichtabhängigen Biogenese des Chloroplasten. *Arabidopsis thaliana* Keimlinge wurden etiiert angezogen und ins Licht transferiert. Nach 0, 1, 2, 4, 8 und 24 h wurden Proben genommen und RNA aus diesen isoliert. Mit genspezifischen Primern wurden die *HCF173*-Transkripte nach reverser Transkription mit Hilfe der Real-Time-PCR analysiert. Pro Zeitpunkt wurden drei PCR-Reaktionen durchgeführt und die Ergebnisse gemittelt (A). Als Kontrolle diente eine Real-Time-PCR-Analyse der Actin-Transkripte (B). Die C_T -Werte sind in den Tabellen aufgelistet. (C) Anstieg der relativen *HCF173*-RNA-Mengen bei Belichtung von etiierten Keimlingen. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Ergebnis von zwei unabhängigen Versuchen.

IV. Diskussion

Das Photosystem II stellt ein genetisches Mosaik aus kern- und plastidenkodierten Untereinheiten dar. Für einen koordinierten Ablauf der Biogenese des Proteinkomplexes wird somit eine Reihe von Hilfsfaktoren benötigt, die die Expression und Assemblierung der Untereinheiten auf verschiedenen Ebenen der Genexpression in Kern und Plastide beeinflussen und regulieren. Zur Identifizierung dieser Faktoren hat sich in den letzten Jahren der vorwärts gerichtete genetische Ansatz über Analyse und Charakterisierung von nukleären Mutanten mit *hcf*-Phänotyp bewährt. Mittlerweile konnten eine Reihe von Mutanten von *Arabidopsis thaliana* (Meurer et al., 1998; Felder et al., 2001), Gerste (Kim et al., 1994), Mais (Leto und Miles, 1980) und der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* (Kuchka et al., 1988; Rochaix et al., 1989; Girard-Bascou et al., 1992; Yohn et al., 1996; Rattanachakunsoopon et al., 1999) charakterisiert werden, die einen spezifischen Defekt im Photosystem II aufweisen. Mit Hilfe dieser Mutanten konnten einige kernkodierte Hilfsfaktoren, die essentiell für die Biogenese des Membrankomplexes sind, isoliert und kloniert werden. Aus *Chlamydomonas reinhardtii* konnten zum Beispiel die Gene der Untereinheiten RB38, RB47 und RB60 eines RNA-bindenden Komplexes, der für die lichtinduzierte Translation der *PsbA*-RNA benötigt wird, isoliert werden (Kim und Mayfield, 1997; Yohn et al., 1998a; Barnes et al., 2004). Die Identifizierung der vierten Komponente des Komplexes RB55 steht noch aus. Ein weiteres Protein, das ebenfalls im Zusammenhang mit der lichtgesteuerten Translationsinitiation der *PsbA*-RNA in *Chlamydomonas reinhardtii* diskutiert wird, wird durch die putative Oxidoreduktase Tba1 repräsentiert (Somanchi et al., 2005). Des Weiteren konnten die zwei Proteine Nac2 und Mbb1 identifiziert und charakterisiert werden. Diese Polypeptide gehören beide zur Klasse der TPR- (Tetratricopeptide-Repeat-) Proteine. Sie liegen mit anderen Proteinen assoziiert in Komplexen im Stroma des Chloroplasten vor und sind für die Prozessierung, Stabilisierung und/oder Translation der *PsbD*-Transkripte bzw. der Transkripte des *PsbB/PsbT/PsbH*-Clusters erforderlich (Boudreau et al., 2000; Vaistij et al., 2000b; Vaistij et al., 2000a). Für Mbb1 konnte aus *Arabidopsis thaliana* das orthologe Protein HCF107 isoliert werden. HCF107 ist für die Stabilisierung und Translation der 5'-prozessierten *PsbH*-Transkripte und die Translation der 5'-prozessierten *PsbB*-Transkripte verantwortlich. Im Gegensatz zu Mbb1 liegt es jedoch membranassoziiert im Komplex vor (Felder et al., 2001; Sane et al., 2005). Ein weiteres Regulator- und Hilfsprotein für die Biogenese des Photosystems II in höheren Pflanzen stellt HCF136 dar. Dieses Protein spielt als Chaperon-ähnlicher Faktor bei der Assemblierung des Reaktionszentrums des Photosystems II eine essentielle Rolle (Plücken et al., 2002).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte mit Hilfe der durch EMS-Mutagenese hergestellten *hcf*-Mutantenlinie *hcf173* ein weiterer essentieller regulatorischer Hilfsfaktor für die Biogenese des Photosystems II isoliert werden.

1. Die Mutante *hcf173* weist Defekte in der Translationsinitiation und/oder Stabilisierung der *PsbA*-RNA auf

Die Mutante *hcf173* zeigt einen deutlichen Defekt im Photosystem II. Dies konnte durch die spektroskopische Analyse mit Hilfe der Chlorophyll-Fluoreszenz-Induktion dargelegt werden. Das Verhältnis von variabler Fluoreszenz zu maximaler Fluoreszenz ist in der Mutante deutlich reduziert. Mit einem Wert von etwa 0,15 liegt dieser deutlich unter dem für PS II-Mutanten angesetzten Schwellenwert von 0,5 (Meurer et al., 1996b). *Hcf173* wurde somit in die Gruppe der PS II-Mutanten eingeordnet. Die stark herabgesetzte Quantenausbeute dieses Photosystems unterstützt diese Klassifizierung. Somit scheint in *hcf173* nur eine geringe Anzahl an funktionellen PS II-Komplexen zu existieren. Die kaum herabgesetzte photochemische Löschung der Chlorophyllfluoreszenz und die Ergebnisse der P700-Redoxkinetiken deuten an, dass die Elektronentransportkette nach dem Verlassen der Elektronen des PS II relativ ungehindert ablaufen kann und somit ein aktiver Cytochrom b_6 -Komplex und ein aktives Photosystem I in der Mutante vorliegen.

Diese Daten stehen in Einklang mit den Analysen hinsichtlich der Proteinspiegel der Untereinheiten der vier großen Membrankomplexe der Thylakoidmembran. Immunoblotanalysen legten dar, dass die Polypeptide des Photosystems II in der Mutante drastisch reduziert sind. Die kernkodierte, extrinsische 23 und 34 kDa Proteine des Wasserspaltungsapparates sind in der Mutante deutlich auf etwa 12,5 % der im Wildtyp akkumulierenden Menge herabgesetzt. Eine noch drastischere Reduktion zeigen mit Ausnahme der α - und β -Untereinheiten des Cytochrom b_{559} alle untersuchten Untereinheiten des PS II-Kernkomplexes (D1, D2, CP43 und CP47). Diese sind in der Mutante nicht oder kaum nachweisbar. Die Cytochrom b_{559} -Untereinheiten des Reaktionszentrums sind dagegen nur auf etwa 25 % des Wildtypniveaus reduziert. Der Grund für diese Diskrepanz in der Akkumulation könnte darin liegen, dass Cytochrom b_{559} mit D1 und D2 als kleinstes Assemblierungsintermediat bei der Biogenese des Photosystems II detektiert wurde (Müller und Eichacker, 1999). Möglicherweise ist das Vorhandensein von Cytochrom b_{559} eine Voraussetzung für die Bildung dieses ersten Assemblierungskomplexes und die weitere stabile Assemblierung des Photosystems II. So konnte durch die Charakterisierung einer *PsbE*-Nullmutante von *Chlamydomonas reinhardtii* gezeigt werden, dass das Fehlen der α -Untereinheit von Cytochrom b_{559} die Synthese der PSII-Untereinheiten beeinträchtigte oder aber die schnelle Degradation der neu synthetisierten Untereinheiten zur Folge hatte. Eine *PsbA*-Deletionsmutante zeigte hingegen wildtypische Proteinspiegel hinsichtlich Cytochrom b_{559} (Morais et al., 1998).

In der Mutante sind die Proteinspiegel des PS I ebenfalls reduziert. Allerdings nicht in dem starken Ausmaß, wie es für das PS II zu beobachten ist. Im Gegensatz zur Anzucht unter Normallicht können die Untereinheiten des Photosystems I in *hcf173* unter Schwachlichtbedingungen zu etwa 50 - 75 % des Wildtypniveaus akkumulieren. Die PS II-Polypeptide allerdings sind unter Schwachlichtbedingungen in ihrer Akkumulation ähnlich betroffen wie unter Normallicht (Plücken et al., 2002). Die Reduktion des PS I in der Mutante scheint somit eher ein sekundärer Effekt zu sein. Es wird vermutet, dass schädigende oxidative Prozesse hierfür verantwortlich sind (Plücken et al., 2002). Da die Untereinheiten des Cytochrom b_6 -Komplexes und der ATPase normal akkumulieren, stellt *hcf173* somit eine Mutante dar, die einen spezifischen Defekt im Photosystem II aufweist.

In vivo Einbauexperimente mit radioaktiv markiertem Methionin zeigten, dass die mangelnde Akkumulation des Photosystems II in der reduzierten Synthese des D1 Proteins begründet ist. Es wird etwa nur ein Achtel der wildtypischen Menge synthetisiert. Das D2 Protein des Reaktionszentrums und die beiden inneren Antennenproteine CP43, CP47 des PS II Kernkomplexes dagegen werden normal exprimiert. Durch das Fehlen der D1-Untereinheit können allerdings keine funktionellen Photosysteme zusammengebaut werden. Die synthetisierten Proteine werden nicht benötigt und daher degradiert. Somit ist die fehlende Akkumulation dieser Proteine wohl ein sekundärer Effekt. Es fällt auf, dass die Akkumulation von D1 stärker betroffen ist als die Syntheserate. Dies ist möglicherweise mit dem hohen Turnover des D1 Proteins zu erklären. Da das Protein Hauptangriffspunkt hochreaktiver Sauerstoffverbindungen ist, wird es leicht geschädigt und muss ausgetauscht werden (Mattoo et al., 1984; Sundby et al., 1993). Dieser Austausch ist in *hcf173* vermutlich nicht mehr gewährleistet und die Rate des neu benötigten D1 übersteigt die des tatsächlich synthetisierten Proteins.

Northernblot-Experimente zeigten auf, dass in der Mutante *hcf173* nur die *PsbA*-RNA in deutlich geringeren Mengen akkumuliert. Der Transkriptspiegel entspricht etwa 25 % des Wildtypniveaus. Die *PsaA/B*-RNA ist in der Mutante zwar auch leicht reduziert, allerdings bleibt diese Reduktion ohne Auswirkungen, da die Synthese der Proteine in der Mutante vergleichbar mit der des Wildtyps ist. Die leichte Reduktion der *PsaA/B*-RNA-Pegel ist möglicherweise eine Folge des Mangels an aktivem PS II. Für Senf konnte gezeigt werden, dass der Redoxzustand des Plastochinonpools die Transkription der *PsbA*- und *PsaA/B*-Gene regulieren kann. Ein oxidiertes Plastochinonpool weist auf einen Mangel an PS II hin und steigert die Expression von *PsbA* auf Ebene der Transkription. Ein vollständig reduzierter Plastochinonpool hingegen weist darauf hin, dass die Elektronen nicht an PS I weitergeleitet werden können und induziert die Expression von *PsaA/B* (Pfannschmidt et al., 1999). Da in *hcf173* kaum aktives PS II vorliegt, sollte das Plastochinon hauptsächlich in seiner oxidierten Form vorliegen und somit als Signalgeber zur Repression der *PsaA/B*-Expression führen und gleichzeitig die Transkription der *PsbA*-RNA fördern. Auf den ersten Blick scheint letzteres nicht zuzutreffen, da die Transkriptpegel der *PsbA*-RNA stark reduziert sind. Allerdings konnte in früheren Versuchen festgestellt werden, dass das Transkript in der Mutante etwa achtmal instabiler ist als im Wildtyp (Töller, 1999). Die Stabilität der *PsbA*-RNA ist somit etwa um den Faktor zwei stärker beeinträchtigt als ihre Akkumulation, was vermuten lässt, dass die mangelnde Stabilität geringfügig durch eine erhöhte Transkriptionsrate kaschiert wird.

Der Defekt in der Biogenese des Photosystems II wurde somit auf posttranskriptioneller Ebene der *PsbA*-Expression lokalisiert. Er macht sich in reduzierter Stabilität des *PsbA*-Transkriptes und seiner mangelnden Synthese bemerkbar. Die Regulation der RNA-Stabilität/-Akkumulation und der Translation sind häufig eng miteinander verknüpft, und es ist schwierig, diese Prozesse eindeutig voneinander abzugrenzen (Barkan, 1993; Boudreau et al., 2000; Vaistij et al., 2000b; Meurer et al., 2002; Lezhneva und Meurer, 2004). Einen guten Ansatz zur Lösung dieses Problems bietet die Applikation von Translationsinhibitoren. Die Gabe von Lincomycin und Chloramphenicol erlaubte zum Beispiel eine Bestimmung der posttranskriptionellen Defekte der PSI-Mutanten *hcf109* und *hcf145* von *Arabidopsis thaliana*

auf Ebene der Translationstermination bzw. der RNA-Stabilität der *PsaA-PsaB-Rps14*-Transkripte (Meurer et al., 2002; Lezhneva und Meurer, 2004). Die Antibiotika Lincomycin und Chloramphenicol inhibieren beide das Peptidyltransferase-Zentrum der 70S-Ribosomen durch Wechselwirkung mit der 23S-rRNA der großen 50S-Untereinheit, so dass keine Elongation mehr stattfinden kann (Schlünzen et al., 2001). Durch Applikation der Antibiotika werden in den Mutanten Effekte auf die Stabilität der RNA, die aufgrund möglicher Defekte in der Translationseelongation und –termination auftreten, verhindert. Somit erlaubt die Gabe von Lincomycin und Chloramphenicol in Mutanten, die primär in der Elongation und Termination beeinträchtigt sind, die Akkumulation der betroffenen reduzierten RNA-Pegel. Ist in der Mutante primär die RNA-Stabilität bzw. Translationsinitiation beeinträchtigt, so wird der Defekt nicht durch die Translationsinhibitoren verdeckt und die betroffenen Transkripte können auch unter Einfluss der Antibiotika nicht angehäuft werden. Auch im Fall von *hcf173* konnte der Primäreffekt der EMS-Mutation näher eingegrenzt werden. Da die *PsbA*-RNA-Transkripte bei kontinuierlicher Applikation von Lincomycin und Chloramphenicol in einem Beobachtungszeitraum von 27 h nicht akkumulierten, kann ein primärer Defekt in der Mutante auf Ebene der Translationseelongation und –termination ausgeschlossen werden. Da Lincomycin die RNA von Ribosomen befreit (Edhofer et al., 1998), kann zudem geschlossen werden, dass die Nukleaseaktivität in der Mutante nicht mit den Polysomen assoziiert ist. Somit wird der Faktor HCF173 für die Stabilisierung der *PsbA*-RNA oder aber für die Translationsinitiation benötigt. Für letzteres spricht, dass die Synthese von D1 in der Mutante *hcf173* stärker herabgesetzt ist als die *PsbA*-Transkriptspiegel.

Zusammengefasst zeigte die Charakterisierung der Mutante *hcf173* einen Defekt auf posttranskriptioneller Ebene in der Biogenese des PS II auf. Die mangelnde Synthese und somit Bereitstellung des D1-Proteins zur Assemblierung des PS II beruht primär auf der mangelnden Stabilität des kodierenden *PsbA*-Transkripts und/oder eines Defektes in der Translationsinitiation.

2. Studien zur Funktion des kernkodierten Biogenesefaktors HCF173

2.1 Klonierung des Gens *HCF173* und Komplementation des mutanten Phänotyps

Um den Faktor HCF173 und seine Funktionen eingehender charakterisieren zu können, musste das defekte Gen zunächst über seine Position kloniert werden, da es sich bei *hcf173* um eine EMS-Mutantenlinie handelt. Mit Hilfe molekularer Marker konnte das Gen *HCF173* auf Chromosom 1 kartiert werden. Allerdings reichte die Kartierungspopulation von 1279 F2-Individuen bzw. F3-Familien nicht zur eindeutigen Identifizierung des *HCF173*-Locus aus. Die drei verbliebenen Kandidatengene mit vorhergesagter Chloroplastentransitsequenz wurden auf ihre Sequenz und ihre RNA-Spiegel in der Mutante überprüft. Nur im Fall von At1g16720 war die Basensequenz des Gens verändert. Der Basenaustausch von Cytosin nach Thymin, der für die EMS-Mutagenese in *Arabidopsis thaliana* typisch ist (Ashburner, 1990; Greene et al., 2003), führte ein vorzeitiges Stop-Codon in die Sequenz ein. Nur die RNA-Spiegel dieses Gens waren in der Mutante herabgesetzt. Möglicherweise ist dies auf den sogenannten Nonsense Mediated Decay (NMD) zurückzuführen. Dieser Mechanismus

schützt die Zellen bzw. Organellen vor der Anhäufung von funktionslosen und verkürzten Proteinen und sorgt für den Abbau von Transkripten mit falsch positionierten Stop-Codons (Baker und Parker, 2004). Durch Transformation der Mutante mit der cDNA des Gens At1g16720 konnte der *hcf*-Phänotyp von *hcf173* erfolgreich komplementiert werden. Somit konnte gezeigt werden, dass nur die Punktmutation in At1g16720 für den *hcf*-Phänotyp verantwortlich ist. Dies wurde durch die Entdeckung eines zweiten Allels der Mutante aus einer Sammlung von T-DNA-Mutanten bestätigt. At1g16720 ist also mit *HCF173* identisch. In der komplementierten Linie wurde die cDNA mit Beginn des Startcodons unter Kontrolle des 35S-Promotors des Cauliflower Mosaic Virus exprimiert. Dies zeigte, dass nicht zwingend der endogene Promotor von *HCF173* für die Expression des Proteins erforderlich ist. Zudem wirkt sich eine eventuelle Überexpression der RNA oder des Proteins durch den starken Promotor nicht negativ auf die Funktion des Faktors aus.

Das Protein *HCF173* zeigte bei Datenbankrecherchen in bestimmten Bereichen eine Ähnlichkeit zu vorhergesagten Nukleosiddiphosphat-Zuckerepimerasen (Aminosäurereste 161 - 260 und 461 - 560). Nukleosiddiphosphat-Zuckerepimerasen gehören zu der Superfamilie der SDR-(short chain dehydrogenase/reductase) Proteine. SDR-Proteine sind Enzyme mit ca. 250-350 Aminosäureresten, die mit NAD(H) oder NADP(H) als Coenzymen als Dehydrogenasen, Dehydratasen, Epimerasen und Isomerasen wirken können. Ihre Substrate reichen von Alkoholen, über Steroide und Zucker bis hin zu xenobiotischen Stoffen. Bisher sind über 3000 verschiedene primäre Sequenzen der SDR-Proteine bekannt, die in paarweisen Vergleichen oft nur 15 - 30 % identische Aminosäurereste aufweisen. Die größte Ähnlichkeit untereinander besteht zwischen diesen Proteinen im N-Terminus, mit dem NAD(H) bzw. NADP(H) gebunden werden können. Hier befinden sich ein konserviertes glycinreiches Motiv und ein konservierter Aspartatrest, die für die Bindung der Co-Enzyme benötigt werden. Mit dem C-terminalen Teil können die SDR-Proteine die verschiedensten Substrate binden, so dass hier nur geringe Ähnlichkeiten untereinander zu finden sind (Jornvall et al., 1995; Kallberg et al., 2002; Oppermann et al., 2003). Die Zugehörigkeit der Proteine zur SDR-Familie macht sich eher bei einem Vergleich ihrer dreidimensionalen Struktur bemerkbar. So zeigen alle Proteine, deren Strukturen bisher bestimmt wurden, ein sehr ähnliches dreidimensionales Faltungsmuster aus sich abwechselnden α -Helices und β -Strängen. Diese umfassen einen so genannten Rossmann-Fold, der aus einem zentralen parallelem β -Faltblatt besteht, das von den α -Helices flankiert wird (Oppermann et al., 2003). Die Dinukleotid-Bindedomäne, die das oben erwähnte glycinreiche Motiv beinhaltet, erstreckt sich über das erste $\beta\alpha\beta$ -Motiv des Rossmann-Folds (Jornvall et al., 1995; Filling et al., 2002). Für die katalytische Aktivität benötigen die SDR-Proteine das Motiv YXXXX, das auf α -Helix fünf des Rossmann-Folds zu finden ist (Jornvall et al., 1995).

HCF173 zeigt in zwei einhundert Aminosäuren langen Bereichen Ähnlichkeit zu der Familie der SDR-Proteine. Datenbank-Recherchen lassen vermuten, dass diese Bereiche ursprünglich eine geschlossene Domäne bildeten und mit der Zeit durch evolutionäre Prozesse voneinander getrennt wurden. Wurden die beiden Bereiche als ein Block behandelt, so erhielt man bei einer BLAST-Analyse als besten Treffer ein 219 AS langes Protein aus *Synechocystis sp.* PCC 6803 (NP_441422), das dem YCF39-Protein aus *Cyanophora paradoxa* (NP_043157) ähnelt (Abb. 31).

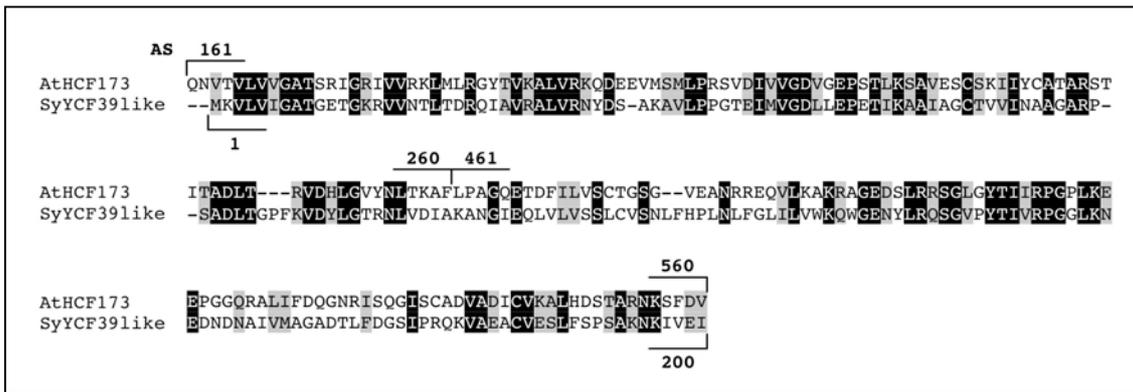


Abb. 31: Sequenzvergleich der HCF173-Aminosäurereste 161 bis 260 und 460 bis 560 mit den ersten 200 von insgesamt 219 Aminosäureresten eines YCF39-ähnlichen Protein aus *Synechocystis* sp. (NP_441422). Schwarz hinterlegte Aminosäuren bedeuten identische Reste, grau hinterlegte bedeuten ähnliche Reste.

Das Protein aus *Synechocystis* zeigt über den verglichenen Bereich 34 % identische Aminosäuren und insgesamt eine Ähnlichkeit von 54 %. Diese Bereiche besitzen nach Vorhersage der Sekundärstruktur mit dem Programm Jpred (Cuff und Barton, 2000) die typische α/β -Struktur der SDR-Proteine. Das glycinreiche Motiv (TGXXXGXXG) der klassischen SDR-Proteine zur Bindung von NAD(P)(H) ist in HCF173 (AS 169-175) nur schwach konserviert (Abb. 19). Das Threonin und das zweite Glycin sind in HCF173 gegen ein Valin bzw. ein Arginin ausgetauscht. Allerdings liegt das Motiv laut Vorhersage der Sekundärstruktur in dem geforderten $\beta\alpha\beta$ -Turn, und ein weiterer wichtiger Aspartatrest, der ebenfalls für die Bindung des Dinukleotids wichtig ist, ist konserviert. Weitere stark konservierte Aminosäurereste des $\beta\alpha\beta$ -Turns, die möglicherweise für die Strukturhaltung bedeutsam sind, sind ebenfalls in HCF173 zu finden (Abb. 19 und Filling et al., 2002). Somit besteht die Möglichkeit, dass HCF173 NAD(H) oder NADP(H) binden kann. Für die Alkoholdehydrogenase von *Drosophila* konnte dargelegt werden, dass das Enzym auch ohne konserviertes glycinreiches Motiv dazu in der Lage ist, NAD⁺ zu binden (Sofer und Ursprung, 1968; Filling et al., 2002). Ein für die enzymatische Aktivität der SDR-Proteine wichtiges Sequenzmotiv (YXXXK) ist in HCF173 zwar vorhanden (Aminosäuren 254-258), allerdings befindet sich dieses Motiv nicht in dem für die SDR-Proteine typischen Abstand vom glycinreichen Motiv (Oppermann et al., 2003; Persson et al., 2003). Zusätzlich zeigt Abbildung 19, dass der Tyrosinrest in den Reis-Homologen nicht konserviert ist. Daher besitzt HCF173 wahrscheinlich keine Dehydrogenase/Reduktase-Aktivität, sondern erfüllt eine andere Funktion. Mittlerweile wurden verschiedene Proteine identifiziert, die eine entfernte Verwandtschaft zu den SDR-Proteinen aufweisen und keine Dehydrogenaseaktivität mehr besitzen (Baker et al., 1998; Pereira et al., 2001; Stammers et al., 2001). So zeigt zum Beispiel NmrA, ein negativer Regulator der Transkription im Stickstoff-Metabolismus von *Aspergillus nidulans*, nur auf Ebene der dreidimensionalen Struktur Ähnlichkeit zu den SDR-Proteinen. Die deutlichsten Übereinstimmungen zeigte das Protein zur Struktur der Nukleosiddiphosphat-Zuckerepimerase UDP-Galactose-Epimerase (Stammers et al., 2001). NmrA kann trotz des fehlenden glycinreichen Motivs NAD⁺ bzw. NADP⁺ binden und zwar mit einer wesentlich höheren Affinität als die reduzierten Gegenstücke der Moleküle. Aus diesem Grund wird das Protein als Redox-Sensor diskutiert

(Lamb et al., 2003). Interessanterweise konnte durch die Strukturaufklärung von NmrA gezeigt werden, dass das zentrale β -Faltblatt des Rossmann-Folds aus sechs β -Strängen des N-Terminus (β -Stränge 1 – 6 des Proteins) und einem β -Strang des C-Terminus (β -Strang 10) des Proteins zusammengesetzt ist; der Bereich dazwischen trägt nicht zur Bildung des Rossmann-Folds bei (Stammers et al., 2001). Möglicherweise trifft für HCF173 Ähnliches zu, so dass durch die dreidimensionale Anordnung des Proteins die beiden SDR-ähnlichen Bereiche den Rossmann-Fold ausbilden könnten und somit die Grundstruktur der SDR-Proteine erhalten bliebe. Die große Insertion von zweihundert Aminosäuren könnte einen zweiten distinkten Bereich innerhalb der dreidimensionalen Struktur ausbilden, der z.B. für die Wechselwirkung mit anderen Proteinen oder der Chloroplastenmembran verantwortlich sein könnte.

Ein zweites, noch wesentlich interessanteres Protein mit Verwandtschaft zu den SDR-Proteinen stellt CSP41 dar (Baker et al., 1998). Dieses Protein ist eine kernkodierte, plastidäre Endonuklease, die zunächst in Spinat identifiziert wurde. Das Enzym bindet sequenzunspezifisch RNA-Haarnadelstrukturen und schneidet *in vitro* effizient in den 3'-Haarnadelstrukturen synthetischer *PetD*-, *PsbA*- und *RbcL*-RNAs (Yang et al., 1996; Yang und Stern, 1997; Bollenbach und Stern, 2003a). Experimente mit CSP41-Antisense Pflanzen von Tabak zeigten einen deutlichen Rückgang in der Degradation der *PetD*-, *PsbA*- und *RbcL*-Transkripte. Im Fall der *PsbA*-RNA wurde festgestellt, dass die Transkripte in den Antisense-Pflanzen etwa siebenmal stabiler waren als im Wildtyp (Bollenbach et al., 2003). Da der Abbau der RNA im Chloroplasten wohl durch endonukleolytische Schnitte eingeleitet wird (Klaff, 1995; Lisitsky et al., 1996), könnte CSP41 *in vivo* für die Initiation des Abbaus dieser Transkripte verantwortlich sein. Die Bindung der RNA geschieht mit Hilfe der Nukleotidbindedomäne des Enzyms, während die Endonukleasefunktion von einem anderen Teil des Enzyms vermittelt wird (Bollenbach und Stern, 2003b). Die RNA-bindende Eigenschaft der Nukleotidbindedomäne konnte bei verschiedenen Dehydrogenasen festgestellt werden, die an AU-reiche Regionen ihrer Ziel-RNAs binden können (Hentze, 1994; Nagy et al., 2000). Somit könnte HCF173 neben NAD(H) bzw. NADP(H) als putative Liganden auch RNA binden. Dies stünde in Einklang mit der Funktion von HCF173 als RNA-stabilisierendem Protein. Mit HCF173 konnte somit neben CSP41 ein zweites Protein mit Verwandtschaft zu den SDR-Proteinen identifiziert werden, das eine Funktion im RNA-Metabolismus des Chloroplasten besitzt.

Die größte Ähnlichkeit von HCF173 besteht zum UOS1-Protein aus Erbse und seinen Homologen (Abb. 19). Die Funktion und der genaue Wirkort dieser Proteine sind nicht bekannt. Aufgrund der Ähnlichkeit zu HCF173, die in den SDR-ähnlichen Bereichen ausgeprägter ist, wäre es aber durchaus denkbar, dass die beiden Proteine eine vergleichbare Funktion bzw. einen ähnlichen Wirkmechanismus besitzen.

2.2 Die Assoziation von HCF173 mit der Chloroplastenmembran

Um zu klären, ob HCF173 seine Funktion im Chloroplasten ausübt und in welchem Kompartiment des Organells, wurden Lokalisationsstudien mit Pflanzenlinien durchgeführt, die HCF173-Fusionsproteine im *hcf173*-mutanten Hintergrund exprimierten. Durch spektroskopische Analysen und Untersuchung der RNA- und Proteinspiegel der

Komplementantenlinien HCF173-cTAP und HCF173-ctHA, konnte dargelegt werden, dass die Fusionsproteine voll funktionsfähig sind und die Proteinetiketten im C-Terminus die Funktion von HCF173 nicht beeinträchtigen. Die Erkenntnisse, die über die Fusionsproteine gewonnen wurden, waren somit auf das wildtypische HCF173 anwendbar. Die Lokalisationsstudien zeigten für beide Komplementationslinien, dass die Fusionsproteine in den Chloroplasten transportiert wurden und dort fast ausschließlich mit dem Membransystem des Organells assoziiert sind. Die Tatsache, dass diese Assoziation sowohl mit den Extrakten von HCF173-cTAP-Pflanzen als auch mit denen der HCF173-ctHA-Pflanzen nachgewiesen wurde, machen es unwahrscheinlich, dass die Bindung durch das C-terminale Etikett hervorgerufen wurde. Zudem konnte das Protein Mbb1 durch die Etikettierung mit einem dreifachen HA-Etikett als stromale Komponente des Chloroplasten nachgewiesen werden (Vaistij et al., 2000b). Salzwaschungen mit Natriumcarbonat konnten einen großen Teil von HCF173 von den Membranen entfernen, so dass HCF173 wohl nur peripher an das Membransystem gebunden ist. Die Bindung wird wahrscheinlich nicht über ionische Wechselwirkungen, sondern eher durch leichte hydrophobe Wechselwirkungen mit der Thylakoidmembran verwirklicht. Möglich wäre eine solche Interaktion über den eher hydrophoben Part (AS 146 – 240) von HCF173 als eine Art Membrananker oder aber die Bildung einer hydrophoben Region auf der Oberfläche des Proteins durch die Faltung in eine bestimmte Tertiärstruktur. Gegen erstere Möglichkeit spricht allerdings die Anwesenheit des putativen NAD(P)(H)-Bindemotivs in diesem Bereich. Für die zweite Möglichkeit böte sich der Bereich zwischen den SDR-ähnlichen Regionen an. Allerdings konnte nicht festgestellt werden, ob die Membranassoziation direkter oder nur indirekter Natur ist. So könnten weitere Proteine diese Bindung vermitteln. Allerdings wird HCF173 aufgrund des 35S-Promotors in den Komplementantenlinien wahrscheinlich überexprimiert, so dass mutmaßlich nicht alles HCF173 mit anderen Faktoren interagiert. Die nahezu vollständige Membranassoziation deutet daher eher auf eine direkte Bindung von HCF173 hin. Da die Chloroplastenmembranen nicht weiter fraktioniert wurden, konnte nicht gezeigt werden, ob HCF173 an der inneren Hüllmembran, die Granathylakoide, die Stromathylakoide und/oder sogenannten Low-Density-Membranen gebunden ist. Low-Density-Membranen entsprechen in ihrer Dichte und der Lipidzusammensetzung den Eigenschaften der inneren Chloroplastenhüllmembran, sie sind allerdings mit den Thylakoiden assoziiert. Neben der inneren Hüllmembran werden die Low-Density-Membranen in *Chlamydomonas reinhardtii* als Syntheseort der Proteine der Thylakoidmembran vorgeschlagen (Zerges, 2000). In reifen Chloroplasten ist neu synthetisiertes D1 hauptsächlich für Reparationszwecke des photooxidativ geschädigten PS II bestimmt (Kettunen et al., 1997). Die Translation für diesen Prozess findet an den Stromalamellen der Thylakoide statt (Boschetti et al., 1990). Aufgrund des starken Phänotyps von *hcf173* ist zu vermuten, dass HCF173 für diesen Prozess benötigt wird und daher hauptsächlich an den stromaexponierten Membranen lokalisiert ist. Allerdings kann aufgrund der *HCF173*-RNA-Expression während der Chloroplastenbiogenese auch vermutet werden, dass HCF173 an der *de novo*-Biogenese des PS II im reifen Chloroplasten beteiligt ist und somit zumindest zu einem kleinen Teil mit der inneren Thylakoidmembran oder den LD-Membranen assoziiert ist. Eine Assoziation mit den Granathylakoiden ist eher unwahrscheinlich, da die dichte Stapelung der Thylakoide keinen Zugang für RNA und daran bindende Proteine bietet.

Die Membranassoziation von Proteinen, die mit dem RNA-Metabolismus und Translationsprozessen des Chloroplasten in Zusammenhang stehen, konnte schon in mehreren Fällen belegt werden (Zerges und Rochaix, 1998; Ossenbühl et al., 2002; Sane et al., 2005). HCF173 ist allerdings das erste isolierte membranständige Protein aus höheren Pflanzen, das spezifisch für die Stabilisierung eines einzelnen plastidären Transkriptes bzw. die Translationsaktivierung zuständig ist. In *Arabidopsis thaliana* konnte kürzlich ein zweiter kernkodierter Faktor beschrieben werden, der primär für die Stabilität eines einzelnen Transkriptes benötigt wird (Lezhneva und Meurer, 2004). HCF145 schützt spezifisch das *PsaA-PsaB-Rps14*-Transkript, das die beiden Proteine des Reaktionszentrums des PS I und das S14-Protein der kleinen Untereinheit der plastidären Ribosomen kodiert, vor seiner Degradation. Bisher konnte der Faktor noch nicht isoliert werden und es bleibt spannend zu erfahren, ob auch HCF145 mit dem Membransystem des Chloroplasten assoziiert ist oder ob dieser Faktor aufgrund der ähnlichen Phänotypen der Mutanten strukturelle und funktionelle Ähnlichkeiten zu HCF173 aufweist.

2.3 HCF173 ist Teil eines höhermolekularen Komplexes

Zur Klärung der Fragestellung, ob HCF173 mit anderen Proteinen interagiert, wurden verschiedene Versuchsansätze gewählt. Zunächst wurden solubilisierete Membranproteine im linearen Saccharosegradienten aufgetrennt. Hierbei konnte HCF173 als erstes Indiz für einen HCF173-Komplex in Fraktionen nachgewiesen werden, die Komplexe mit einer Größe von etwa 300 – 400 kDa beinhalten. Die Analyse von solubilisierten Proteinen aus Chloroplastenmembranen der Komplementationslinien HCF173-cTAP und HCF173-ctHA mit Hilfe der Blue-Native-Gelelektrophorese belegte dieses erste Ergebnis eindrucksvoll. So konnte HCF173 als Teil mehrerer Aggregate verschiedener Größen nachgewiesen werden. Im Fall von HCF173-tHA war der größte nachgewiesene Komplex etwa 500 kDa groß, im Fall von HCF173-TAP sogar größer als 669 kDa. Die Signale im Immunoblot wurden mit Abnahme der Komplexgrößen immer stärker; das stärkste Signal wurde vermutlich durch Monomere der Fusionsproteine verursacht. Möglicherweise ist der HCF173-Komplex unter den gewählten Versuchsbedingungen instabil und schwache Interaktionen wurden während der Solubilisierung bereits gelöst. Zusätzlich könnte die vermutete Überexpression der Fusionsproteine durch den 35S-Promotor zu dem starken Signal der Monomere beitragen, da diese aufgrund mangelnder Interaktionspartner nicht zu Komplexen assemblieren können. Die unterschiedlich großen Teilkomplexe in den beiden Vergleichsversuchen sind möglicherweise darauf zurückzuführen, dass die beiden Fusionsproteine unterschiedliche Größen aufweisen, und dass HCF173 mit mehr als einem Molekül an der Zusammensetzung des HCF173-Komplexes beteiligt ist. Durch den Versuch zur Stabilisierung des HCF173-Komplexes durch quervernetzende Agenzien konnten keine neuen Erkenntnisse über die Komplexgröße und seine Zusammensetzung gewonnen werden.

Zur Identifizierung der mit HCF173 interagierenden Komponenten des Komplexes wurde die Affinitätschromatographie als Versuchsansatz gewählt. Da keine geeignete Kontrolllinie, wie zum Beispiel eine Komplementationslinie eines anderen HCF-Proteins mit TAP- oder Triple-HA-Etikett, zur Verfügung stand, wurden Affinitätschromatographien mit Wildtypextrakten als

Kontrollexperiment durchgeführt. Auf diese Weise sollten Proteine, die unspezifisch an das Säulenmaterial binden, identifiziert werden können. Falsch positive Proteine, die durch Wechselwirkung mit dem Protein-Etikett aufgereinigt werden, würden allerdings nicht erkannt werden. Die Ansätze zur Aufreinigung des Fusionsproteins HCF173-TAP und seinen Interaktionspartnern führten nicht zum erhofften Erfolg. HCF173-TAP konnte zwar an die IgG-Sepharose binden, allerdings war das Säulenmaterial nicht stabil und bei der Elution mit SDS und Natriumthiocyanat wurden die Antikörper der Säule zum großen Teil mit eluiert. Zudem war HCF173-TAP im starken Hintergrund durch unspezifisch gebundene Proteine im Coomassie-Gel nicht identifizierbar. Der Versuch, das Fusionsprotein durch TEV-Protease über die Schnittstelle des Enzyms im Protein-Etikett zu eluieren, schlug fehl. Möglicherweise war die Schnittstelle durch die Faltung des Protein-Etiketts nicht zugänglich. Die affinitätschromatische Aufreinigung von HCF173-TAP über eine Calmodulinmatrix war zwar möglich, jedoch war auch hier der Hintergrund durch co-eluierte Proteine zu stark, um Interaktoren des Proteins auszumachen. Der Hintergrund hätte in diesem Fall wahrscheinlich nicht reduziert werden können, da es sich bei den gebundenen Proteinen wohl hauptsächlich um spezifische calmodulinbindende Proteine handelt, die auch im Chloroplasten vorkommen (Bouche et al., 2005).

Als weitere Möglichkeit zur Identifizierung von Interaktoren von HCF173 wurde die Affinitätschromatographie über eine Anti-HA-Matrix angewendet. Mit Hilfe dieser Aufreinigungsmethode konnte bereits das Protein Tba2 aus *Chlamydomonas reinhardtii* mit daran gebundener RNA isoliert werden (Dauvillee et al., 2003). Auch in dieser Arbeit war dieser Ansatz von Erfolg gekrönt. Neben wenigen unspezifisch gebundenen Proteinen konnten HCF173-tHA und ein weiteres als AtHIP1 bezeichnetes Protein aufgereinigt werden, die spezifisch nur im Eluat des HCF173-ctHA-Ansatz zu finden waren. Die Proteine waren in zwei unabhängigen Versuchen in den Eluaten zu finden und ihre Identität konnte beide Male über massenspektrometrische Analyse bestimmt werden. Bei AtHIP1 handelt es sich um ein Protein, das im N-Terminus eine vorhergesagte plastidäre Transitsequenz trägt und somit anscheinend mit HCF173 im selben Zellkompartiment aktiv ist.

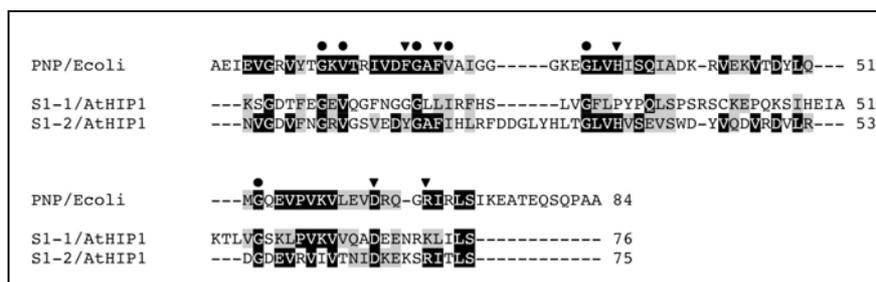


Abb. 32: Sequenzvergleich der beiden S1-Bindedomänen von AtHIP1 mit der S1-Domäne der PNPase aus *E. coli*. Für die Struktur der S1-Domäne wichtige Aminosäurereste sind durch Kreise gekennzeichnet; Dreiecke markieren Aminosäurereste, die für die RNA-Bindung von Bedeutung sind (Bycroft et al., 1997; Draper und Reynaldo, 1999).

Zudem weist das Protein in der weiteren Aminosäuresequenz zwei S1-Bindedomänen auf. S1-Bindedomänen binden an adenin- und uracilreiche Regionen einzelsträngiger RNA oder DNA (Draper und Reynaldo, 1999; Yehudai-Resheff et al., 2003) und wurden zum ersten Mal in der S1-Untereinheit des *E. coli* Ribosoms entdeckt (Subramanian, 1983; Draper und

Reynaldo, 1999). Mittlerweile konnte diese Domäne in den verschiedensten Proteinen identifiziert werden, die mit dem RNA-Metabolismus in Zusammenhang stehen. So findet man sie in den Translationsinitiationsfaktoren IF-1 und eIF-2 α (Gribbskov, 1992), in der Polynukleotid-Phosphorylase (PNPase) von *E. coli* (Regnier et al., 1987), RNA-Helicasen (Company et al., 1991), RNasen und potentiellen Transkriptionsfaktoren (Bycroft et al., 1997). Auch in höheren Pflanzen und Grünalgen wurden Proteine mit S1-Bindedomäne identifiziert. Die ribosomalen S1 Untereinheiten der plastidären Ribosomen CS1 aus Spinat und CreS1 aus *Chlamydomonas reinhardtii* weisen im Gegensatz zu ihrem Homolog aus *E. coli*, das über insgesamt 6 S1-Domänen verfügt, nur noch jeweils drei S1-Motive auf (Franzetti et al., 1992b; Gribbskov, 1992; Merendino et al., 2003; Yamaguchi et al., 2003). Eine weitere plastidenspezifische Untereinheit der Ribosomen (PSRP-7) weist zwei S1-Domänen auf. Des Weiteren besitzen die plastidäre PNPase (Yehudai-Resheff et al., 2001) und das Protein AtRrp4p des Exosoms (Chekanova et al., 2002) eine solche Domäne.

Einige Aminosäurereste des S1-Bindemotivs sind stark konserviert, da sie zur Erhaltung der Sekundärstruktur (Gly-11, Ile/Val-13, Gly-20, Val-23, Gly-31 und Gly-53) und für die Bindung der RNA (Phe/Tyr-19, Phe-22, His-34, Asp-64 und Arg-68) essentiell sind (Bycroft et al., 1997; Draper und Reynaldo, 1999). Die Nummerierung der Aminosäurereste erfolgte übereinstimmend mit der Nummerierung der S1-Domäne der *E. coli* PNPase. Fünf der sechs strukturbestimmenden Reste sind in beiden S1-Domänen des AtHIP1-Proteins vorhanden. Lediglich das Val-23 wurde jeweils gegen ein Isoleucin ausgetauscht (Abb. 32). Da diese Reste jedoch ähnliche Eigenschaften aufweisen, ist eine Zerstörung der S1-Sekundärstruktur eher unwahrscheinlich. Die Reste, die für die RNA-Bindefähigkeit des S1-Motives essentiell sind, sind nur in der zweiten S1-Domäne von AtHIP1 konserviert. In der Domäne S1-1 sind sie bis auf das Arginin an Position 68 verändert. Daher ist es wahrscheinlich, dass nur noch die Domäne S1-2 über RNA-Bindefähigkeit verfügt.

Die Tatsache, dass HCF173 mit einem putativen RNA-Bindeprotein interagiert, unterstreicht seine Rolle im Metabolismus der *PsbA*-RNA. Die Möglichkeit, dass AtHIP1 ein falsch positiv aufgereinigtes Protein ist, scheint aus diesem Grund sehr unwahrscheinlich. Datenbankrecherchen weisen auf zwei putative homologe Proteine von AtHIP1 in Reis hin (ohne Abbildung). Diese Proteine gehen laut Datenbank auf eine RNA zurück, die dem alternativen Spleißen unterliegt. Die Sequenzen von *Arabidopsis thaliana*-ESTs lassen einen solchen Mechanismus für das *Arabidopsis thaliana*-Protein bisher nicht vermuten. Die größte Ähnlichkeit zeigt das Protein zu den S1-ribosomalen-Untereinheiten verschiedener Organismen. Dass AtHIP1 eine solche Untereinheit darstellt, ist allerdings unwahrscheinlich, da AtHIP1 nur zwei S1-Domänen besitzt und in *Arabidopsis thaliana* mit dem Protein NP_850903 ein Protein identifiziert wurde, das im Vergleich zu CS1 über die gesamte Sequenz 80 % identische Aminosäuren und insgesamt 91 % ähnliche Aminosäuren aufweist und somit CS1 wesentlich ähnlicher ist als AtHIP1. AtHIP1 besitzt mit der Chloroplastentransitsequenz ein berechnetes Molekulargewicht von etwa 43 kDa. Im SDS-Gel bandiert es etwa bei 40 kDa. Aufgrund dieser Werte kann darüber spekuliert werden, ob AtHIP1 identisch mit einem etwa 43 kDa großen Protein aus *Arabidopsis thaliana* ist, das redoxabhängig an die 5'-UTR der *PsbA*-RNA bindet (Shen et al., 2001).

Zur Aufklärung, ob der HCF173-Komplex auch seine vermutete Ziel-RNA enthält, wurde eine erneute Affinitätschromatographie mit anschließender Fällung der co-eluierten Nukleinsäuren durchgeführt. Die präzipitierten Nukleinsäuren wurden in wenigen PCR-Zyklen vervielfältigt

und über Hybridisierung mit genspezifischen Sonden sichtbar gemacht. Es wurde deutlich, dass die Anti-HA-Matrix unspezifisch plastidäre RNAs bindet und dass die Verhältnisse der Transkriptmengen der HCF173-tHA-Aufreinigungen zu den Transkriptmengen der Wildtyp-Aufreinigungen in den drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen variieren. Trotzdem konnte eindeutig dargelegt werden, dass die Menge an *PsbA*-RNA, die über den HCF173-tHA-Ansatz eluiert wurde, um ein Vielfaches höher war, als die Menge des Wildtyp-Ansatzes. Der HCF173-Komplex zeigt also eine deutliche Affinität zur *PsbA*-RNA und es kann davon ausgegangen werden, dass der Komplex die *PsbA*-RNA *in vivo* bindet. Ob die Bindung direkt durch HCF173 und/oder durch AtHIP1 erfolgt, sollten weitere Versuche zeigen. Dazu könnten zum Beispiel die beiden Proteine in *E. coli* überexprimiert und aufgereinigt werden und ihre RNA-Bindung über Verzögerungsgele und UV-Quervernetzungsanalysen studiert werden.

2.4 Die zeitliche Expression von *HCF173*

Um einen genaueren Einblick in die Funktion von HCF173 zu erlangen, war es nicht nur von Interesse zu erfahren, wo das Protein wirkt, sondern auch wann es benötigt wird. Dabei galt es zu unterscheiden zwischen dem Entwicklungsstadium der Pflanze und dem tageszeitlichen Ablauf. Da für HCF173 kein Antikörper zur Verfügung stand und die Komplementationslinien HCF173-cTAP und HCF173-ctHA nicht über den endogenen Promotor von *HCF173* verfügten, sondern die Fusionsproteine unter Kontrolle des konstitutiv exprimierenden 35S-Promotors exprimiert wurden, konnten die Untersuchungen hinsichtlich dieses Aspektes nur auf RNA-Ebene durchgeführt werden.

Um die Rolle von HCF173 im frühen Keimlingsstadium während der Chloroplastenbiogenese zu beurteilen, wurden die relativen Pegel der *HCF173*-RNA in etiolierten und belichteten Keimlingen mit Hilfe der Real-Time-PCR bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass die *HCF173*-RNA bereits im Etioplasten exprimiert wird und der Pegel durch Belichtung innerhalb von zwei Stunden um etwa den Faktor 16 anstieg. Somit scheint HCF173 schon während der Entwicklung des Chloroplasten und damit für die *de novo* Biogenese des Photosystem II benötigt zu werden. Möglicherweise ist HCF173 an der Erhöhung der *PsbA*-RNA-Stabilität beteiligt, die während der lichtabhängigen Chloroplastenbiogenese beobachtet werden konnte (Deng und Gruissem, 1987; Klein und Mullet, 1987). Ob Licht allgemein als direkter Signalgeber zur Expression der *HCF173*-RNA beiträgt, konnte im Keimlingsstadium nicht beurteilt werden. Zu diesem Zweck wäre die Bestimmung der RNA-Pegel in reifen Chloroplasten von Interesse. Smith und Mitarbeiter haben in ihren Versuchen die Genexpression verschiedenster Gene und den Kohlehydrat-Stoffwechsel im diurnalen Zyklus mit Hilfe von Genchip-Experimenten untersucht (Smith et al., 2004) und die Ergebnisse in der Datenbank Genevestigator (Zimmermann et al., 2004) hinterlegt. Die *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen wurden zu diesem Zweck in einem 12 h/12 h-Licht-/Dunkel-Rhythmus angezogen. Für *HCF173* zeigte sich, dass die RNA-Pegel in einem 24 h-Rhythmus um etwa den Faktor drei schwankten (Abb. 33). Der Höchstwert des Transkriptspiegels lag bei Einschalten des Lichtes vor, der niedrigste bei Ausschalten der Lichtquellen. Somit stellt das Licht im reifen Chloroplasten eher einen negativen Regulator dar. Eine andere Möglichkeit wäre die circadiane Regulation durch einen vom Licht

unabhängigen Signalgeber. Die Ergebnisse, die hinsichtlich der Expression von HCF173 im ergrünenden Keimling gewonnen wurden, stehen somit im Gegensatz zu den Ergebnissen mit reifen Chloroplasten. Denkbar wäre, dass durch die Erhöhung der *HCF173*-Transkriptmenge während der Dunkelphase zu Tagesbeginn gewährleistet wäre, dass entweder schon das Protein HCF173 translatiert wurde oder aber, dass genug Transkript zur Verfügung steht, um *HCF173* effizient zu translatieren und das Protein schnellstmöglich an seinen Wirkort im Chloroplasten zu transportieren. Im etiolierten Keimling, der noch keinen reifen Chloroplasten besitzt, muss zur Chloroplastenbiogenese und somit auch der Biogenese des PS II die Translation von *HCF173* vermutlich das erste Mal induziert werden, so dass das Licht als endogener Faktor hier als direkter Signalgeber zur Expression der *HCF173*-RNA erscheint.

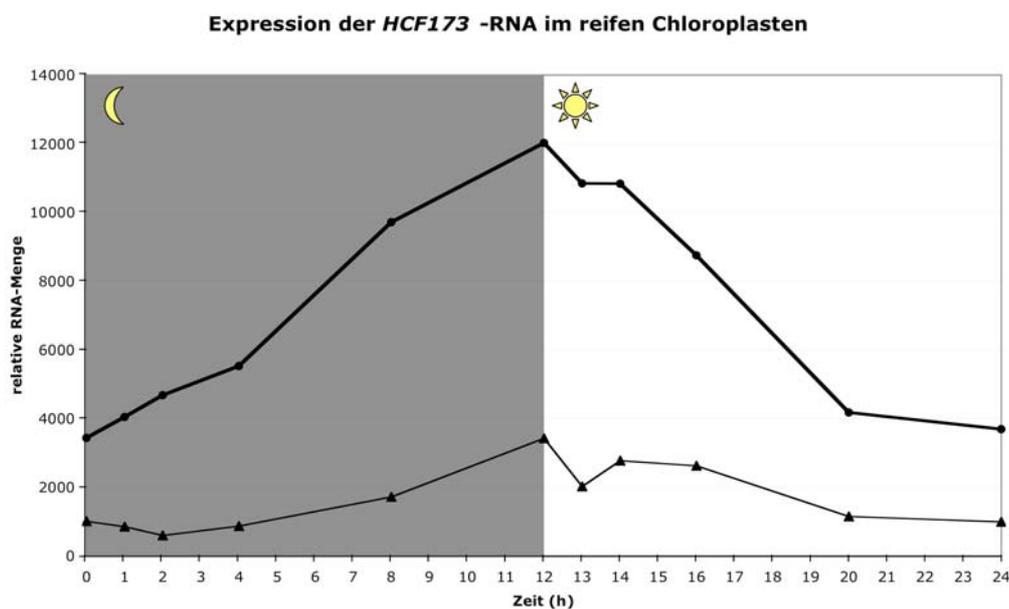


Abb. 33: Expression der *HCF173*-RNA im reifen Chloroplasten. *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen wurden in einem 12 h Dunkel-/12 h Lichtrhythmus angezogen, die RNA zu bestimmten Zeiten isoliert und der Pegel der *HCF173*-RNA (●) mit Hilfe von Genchip-Experimenten von Smith und Mitarbeitern analysiert (Smith et al., 2004). Die Messwerte wurden der Genevestigator-Datenbank entnommen. Zum Vergleich wurden die Werte bezüglich der *HCF107*-RNA (▲) aufgetragen.

Aufgrund der stabilisierenden Wirkung von HCF173 auf die *PsbA*-RNA und seiner möglichen Rolle bei der Initiation der D1-Synthese sollte von dem Protein erwartet werden, dass es seine Funktion während der gesamten Lichtphase erfüllt. Somit erscheint es zunächst paradox, dass sein Transkript nur zu Beginn der Lichtphase stark akkumuliert. Zum einen könnte es möglich sein, dass HCF173 nur zu Beginn der Lichtphase besonders dringend benötigt wird und zweitens darf nicht außer Acht gelassen werden, dass die Expression von HCF173 auch auf translationaler und posttranslationaler Ebene gesteuert werden könnte. So könnten Studien mit Pflanzen, die die Fusionsproteine unter Kontrolle des endogenen *HCF173*-Promotors exprimieren, Aufschluss darüber geben, wann genau das Protein seine Funktion ausübt. Die Betrachtung der RNA-Spiegel darf somit nur als erster Einblick in diese Thematik gewertet werden.

3. Welche Funktion übt HCF173 bzw. der HCF173-Komplex während der Biogenese des Photosystems II aus?

Durch die molekularbiologische und spektroskopische Charakterisierung der EMS-Mutante *hcf173* konnte gezeigt werden, dass der mutante Phänotyp durch ein defektes PS II hervorgerufen wird. Dieser Defekt geht auf mangelnde Synthese des D1-Proteins des Reaktionszentrums zurück. Die herabgesetzte Synthese wird durch einen Fehler in der Translationsinitiation verursacht und/oder ist auf die drastisch reduzierte Stabilität der *PsbA*-RNA in der Mutante zurückzuführen. Die Funktionsanalyse für HCF173 ergab, dass das membranständige Protein als Teil eines Komplexes wirkt. Das Protein AtHIP1 ist ein weiterer Teil dieses Komplexes, der seine Ziel-RNA, das *PsbA*-Transkript, binden kann und so stabilisierend auf die RNA und/oder aktivierend hinsichtlich der D1-Synthese wirkt.

RNA-Stabilität wird hauptsächlich über die untranslatierten Bereiche der Transkripte und daran bindende Faktoren vermittelt. Die 5'- und 3'-UTRs wirken dabei als *cis*-Elemente und sind zum Schutz vor Exonukleasen oft in Haarnadelstrukturen gefaltet. Daran bindende Proteine (*trans*-Elemente) können den Transkripten zusätzliche Stabilität verleihen. Neben Proteinen, deren primäre Funktion die RNA-Stabilisierung selbst darstellt, existieren viele Proteine, die zum Beispiel an der Prozessierung und Reifung der RNAs oder aber an der Translation beteiligt sind, und die RNA-Stabilität nur sekundär beeinflussen (Yohn et al., 1998b; Boudreau et al., 2000; Vaistij et al., 2000b; Meierhoff et al., 2003). Oftmals erfolgt die Bindung an adenin- und uracilreiche Bereiche der untranslatierten Regionen (Yohn et al., 1998a; Nickelsen et al., 1999; Ossenbühl und Nickelsen, 2000; Nakamura et al., 2003; Barnes et al., 2004).

Die Charakterisierung der beiden bisher identifizierten am HCF173-Komplex beteiligten Proteine HCF173 und AtHIP1 lassen vermuten, dass der HCF173-Komplex ebenfalls an die untranslatierten Regionen der *PsbA*-RNA bindet. Sowohl HCF173 als auch AtHIP1 weisen mit der Nukleotidbindestelle als putativem RNA-Bindemotiv und dem S1-Bindemotiv Domänen auf, die präferentiell an AU-reiche Regionen binden (Hentze, 1994; Draper und Reynaldo, 1999; Nagy et al., 2000; Yehudai-Resheff et al., 2003), wie sie in den untranslatierten mRNA-Bereichen vorzufinden sind. So existiert in der 5'-UTR der *PsbA*-RNA die sogenannte AU-Box, die sich als essentiell für die Translation des Transkriptes herausstellte (Hirose und Sugiura, 1996). Daneben sind die Bereiche, in denen Schnittstellen zur Induktion der Degradation der *PsbA*-RNA postuliert werden, ebenfalls mit Adenin und Uracil angereichert (Shen et al., 2001). Für einige Proteinkomplexe konnte dargelegt werden, dass sie zur Bindung an ihre Ziel-RNAs von Sekundär- und Tertiärstrukturen abhängig sind (Ringquist et al., 1995; Klaff et al., 1997; Shen et al., 2001). Ähnliches trifft für das weiter unten diskutierte Protein CSP41 zu (Yang und Stern, 1997). Gegebenenfalls kommt auch diese Art von Bindung für den HCF173-Komplex in Betracht.

Nach heutigem Verständnis leiten endonukleolytische Schnitte die Degradation plastidärer Transkripte ein (Klaff, 1995; Bollenbach et al., 2003). Als aktive Enzyme werden hier vor allem RNase E/G-ähnliche Enzyme, die den RNA-Abbau in Bakterien einleiten (Kuwano et al., 1977; Ono und Kuwano, 1979), und CSP41a diskutiert (Bollenbach et al., 2004). Für CSP41a wurde bereits beschrieben, dass es die 3'-UTRs verschiedener Transkripte, darunter auch die der *PsbA*-RNA, schneiden kann (Yang und Stern, 1997; Bollenbach et al.,

2003). Wie HCF173 ist das Protein entfernt mit der Familie der SDR-Proteine verwandt (Baker et al., 1998). Die Bindung der RNA erfolgt nachweislich über die Nukleotidbindedomäne im N-Terminus des Proteins (Bollenbach und Stern, 2003b). Da HCF173 eine vergleichbare Nukleotidbindedomäne aufweist, könnte das Protein die Bindestellen von CSP41 besetzen und so die Initiation der Degradation verhindern. Ähnliches könnte auf AtHIP1 und die RNase E/G-ähnlichen Proteine zutreffen, da sie das S1-RNA-Bindemotiv teilen (Bycroft et al., 1997). In *Arabidopsis thaliana* existiert ein Gen, das als ein solches Protein kodierendes Gen annotiert wurde. Von diesem Gen existieren mehrere alternativ gespleißte cDNAs in *Arabidopsis thaliana* und damit vermutlich auch mehrere Varianten des Proteins (Bollenbach et al., 2004). Des Weiteren wurde in Spinat ein 67 kDa Protein identifiziert, das Ähnlichkeiten zu RNase E besitzt und die endonukleolytischen Schnitte, die *in vivo* bei der Degradation der *PsbA*-RNA in Spinat auftreten, simulieren kann (Hayes et al., 1996; Kudla et al., 1996).

Neben der Möglichkeit, dass der HCF173-Komplex sequenzspezifisch die Bindestellen der Endonukleasen blockiert, könnte er auch aus sterischen Gründen den RNA-abbauenden Enzymen den Zugang zum Transkript verwehren. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass in *Arabidopsis thaliana* ein Proteinkomplex an nur 35 Nukleotide der 5'-UTR der *PsbA*-RNA bindet, der die identifizierten Ribosomenbindestellen und die AU-Box beinhaltet, aber anscheinend trotzdem die gesamte untranslatierte Region (77 nt) vor dem Abbau durch RNasen schützt (Shen et al., 2001).

Neben dem Schutz vor Endonukleasen könnte der HCF173-Komplex die *PsbA*-RNA auch vor dem Abbau vor 3'→5'- bzw. 5'→3'-Exonukleasen schützen. Der Abbau in 3'→5'-Richtung wird im Chloroplasten von der plastidären PNPase ausgeführt (Yehudai-Resheff et al., 2001). Er erfolgt allerdings erst nach endonukleolytischen Schnitten und Polyadenylierung der entstandenen Fragmente (Kudla et al., 1996; Schuster et al., 1999). Somit erscheint die Möglichkeit, dass der HCF173-Komplex als Schutz vor 3'→5'-Exonukleasen dient, eher unwahrscheinlich. Eine 5'→3'-Exonuklease konnte in höheren Pflanzen bisher noch nicht nachgewiesen werden und es wird diskutiert, ob die 5'→3' exonukleolytische Aktivität, die in *Chlamydomonas reinhardtii* beobachtet wurde, nicht eher durch extensive 5'-Endonukleolyse vorgetäuscht wird (Drager et al., 1999; Bollenbach et al., 2004).

Als weitere mögliche Funktion käme eine Rolle des HCF173-Komplexes bei der Translationsinitiation zur Synthese des D1-Proteins in Betracht. Die Translationsmaschinerie des Chloroplasten zeigt deutliche Verwandtschaft zu der der Eubakterien. Somit ist nicht verwunderlich, dass die Translationsinitiation im Chloroplasten und bei den Prokaryoten ähnlich abläuft. In *E. coli* und verwandten Eubakterien interagiert die kleine Untereinheit des Ribosoms mit dem 5' untranslatierten Bereich der zu translatierenden RNA. Dabei bindet das S1-Protein der 30S-Untereinheit an pyrimidinreiche Sequenzen und das 3'-Ende der 16S-rRNA bildet Basenpaarungen mit der komplementären Shine-Dalgarno-Sequenz in der Nähe des Startcodons aus. An der Translationsinitiation sind die Initiationsfaktoren IF1, IF2 und IF3 beteiligt. IF3 verhindert die vorzeitige Assoziation der 30S- mit der 50S-Untereinheit und ist an der Erkennung der Initiator-tRNA (fMet-tRNA^{fMet}) beteiligt. IF2 ist eine GTPase, die für die Positionierung der Start-tRNA an der P-Stelle der 30S-Untereinheit verantwortlich ist. IF1 erhöht die Affinität von IF2 zur kleinen ribosomalen Untereinheit (zusammengefasst in Gualerzi und Pon, 1990; Boni et al., 1991; Ringquist et al., 1995; Ramakrishnan, 2002). In

Algen und höheren Pflanzen konnten zu den Interaktionsfaktoren IF2 und IF3 (Ma und Spremulli, 1990; Wang und Spremulli, 1991), zum S1-Protein und anderen ribosomalen Proteinen der kleinen Untereinheit homologe Proteine identifiziert werden (Franzetti et al., 1992a; Yamaguchi et al., 2000; Yamaguchi et al., 2002). Durch massenspektrometrische Analyse der Untereinheiten der kleinen Untereinheit plastidärer Ribosomen von *Chlamydomonas reinhardtii* und Spinat wurden mehrere plastidenspezifische Komponenten entdeckt (Yamaguchi et al., 2000; Yamaguchi et al., 2002; Yamaguchi und Subramanian, 2003). Typische Shine-Dalgarno- (SD-) Sequenzen, wie sie in den 5'-UTRs der zu translatierenden mRNAs von *E. coli* und verwandten Eubakterien zu finden sind, sind für die Translationsinitiation im Chloroplasten entbehrlich geworden. In *Chlamydomonas reinhardtii* werden für die effektive Translation der *PsbA*- und *PsbD*-RNA SD-ähnliche Sequenzen benötigt, für die Synthese der Untereinheit IV des Cytochrom b_6/f -Komplexes jedoch nicht (Mayfield et al., 1994; Sakamoto et al., 1994b; Nickelsen et al., 1999). Anhand von *in vitro* Translationsversuchen konnte auch für die *PsbA*-RNA aus Tabak dargelegt werden, dass für ihre Translation keine typische SD-Sequenz erforderlich ist. Vielmehr konnten drei verschiedene *cis*-Elemente identifiziert werden, die für die Translationsinitiation von Bedeutung sind. RBS1 (3 nt) und RBS2 (7 nt) werden kooperativ für eine effiziente Translation benötigt und sind über 3 bzw. 4 Nukleotide komplementär zu 3'-Sequenzen der 16S-rRNA. Es wird vermutet, dass sie als zweiteilige SD-Sequenz wirken. Das dritte *cis*-Element, die oben bereits erwähnte AU-Box (8 nt), ist zwischen RBS1 und RBS2 lokalisiert. Es konnte gezeigt werden, dass die AU-Box essentiell für die Translation der *PsbA*-RNA ist und zur Bindung von *in trans* wirkenden Translationsaktivatoren benötigt wird (Hirose und Sugiura, 1996). Zusätzlich ist die effiziente Translation der *PsbA*-RNA von der Sequenz und Sekundärstruktur einer Haarnadelstruktur abhängig, die sich stromaufwärts von RBS1, RBS2 und der AU-Box befindet und auch eine Rolle in der RNA-Stabilisierung spielt (Zou et al., 2003).

Neben den *cis*-Elementen sind Proteine, die an die 5'-UTRs der zu translatierenden RNAs binden, von essentieller Bedeutung für die Regulation der Translation bzw. ihrer Initiation. Mittlerweile konnten in Algen und höheren Pflanzen verschiedene Faktoren identifiziert werden, die spezifisch die Translation verschiedener Transkripte fördern (zusammengefasst in Barkan und Goldschmidt-Clermont, 2000; Zerges, 2000). *In trans* wirksame Faktoren, die spezifisch die Translation der *PsbA*-RNA beeinflussen, wurden bisher nur in *Chlamydomonas reinhardtii* näher beschrieben. Der eingangs der Diskussion erwähnte Komplex, der sich aus den vier Hauptkomponenten RB38, RB47, RB55 und RB60 und weiteren Proteinen zusammensetzt, bindet eine Haarnadelstruktur in der 5'-UTR der *PsbA*-RNA und reguliert die D1-Synthese in Abhängigkeit von Licht und dem damit zusammenhängenden Redoxzustand des Chloroplasten (Danon und Mayfield, 1991, 1994; Yohn et al., 1996). RB38 und RB47 stellen RNA-bindende Komponenten des Komplexes dar und interagieren mit uracil- bzw. adeninreichen Sequenzen (Yohn et al., 1998a; Barnes et al., 2004). Es wird davon ausgegangen, dass die Reduktion von RB47 die Bindeaktivität des Proteins an die *PsbA*-RNA erhöht und dadurch die Ribosomenassoziation bzw. die Translationsinitiation der *PsbA*-RNA gefördert wird (Fong et al., 2000). Bisher wurde das Protein RB60, eine Disulfidisomerase, als RB47 reduzierendes Protein diskutiert (Kim und Mayfield, 2002). Kürzlich wurde mit Tba1 ein Protein aus *Chlamydomonas reinhardtii* isoliert, das ebenfalls die redoxabhängige Bindung von RB47 an die *PsbA*-RNA fördern kann

(Somanchi et al., 2005). Aufgrund des hohen Oxidationspotentials von Disulfidisomerasen wird nun spekuliert, ob RB60 nicht eher RB47 oxidiert und somit als Gegenspieler von Tba1 fungiert (Somanchi et al., 2005). Die Gene für RB47, RB60 und Tba1 konnten auch in *Arabidopsis thaliana* identifiziert werden (Shen et al., 2001; Somanchi et al., 2005), so dass ein ähnlicher Komplex und Regulationsmechanismus für die *PsbA*-Translation in höheren Pflanzen vermutet werden kann. Durch Immunolokalisationsexperimente wurde dargelegt, dass RB47 mit Membranen niedrigerer Dichte (Low Density-Membranes) assoziiert vorliegt (Zerges und Rochaix, 1998). Aus diesem Grund spielt der Komplex wahrscheinlich eine Rolle bei der D1-Synthese zur *de novo* Biogenese des PSII. Zwar scheint HCF173 auch an der *de novo* Biogenese des PSII beteiligt zu sein, allerdings lässt sich aufgrund des starken Phänotyps von *hcf173* vermuten, dass der HCF173-Komplex hauptsächlich für die Reparatursynthese von D1 benötigt wird. Möglicherweise stellt der HCF173-Komplex die Komponenten des Regulationsmechanismus für die Initiation dieses Prozesses zur Verfügung. Direkte Hinweise auf eine mögliche Redoxregulierung des HCF173-Komplexes existieren bisher nicht. Da HCF173 und AtHIP1 putative RNA-Bindedomänen aufweisen, die präferentiell mit AU-reichen Regionen wechselwirken, besteht die Möglichkeit, dass der HCF173-Komplex durch Bindung an die oben beschriebene AU-Box in der 5'-UTR als Aktivator der Translation der *PsbA*-RNA wirkt.

Eine weitere Funktionsmöglichkeit von HCF173 und seinem Komplex, die durchaus mit der Initiation der D1-Synthese verknüpft sein kann, ergibt sich über die Membranständigkeit des Proteins. Da die Translation des D1-Proteins an membranständigen Ribosomen erfolgt, könnte der Komplex dazu dienen, die *PsbA*-RNA an die Thylakoidmembran zu binden, um eine schnelle und effektive Translation der *PsbA*-RNA und Insertion des D1-Proteins zu gewährleisten. Eine solche Funktion wurde bereits einigen mitochondrialen Proteinen aus *Saccharomyces cerevisiae* zugeschrieben, die spezifisch die 5'-UTRs der RNAs membranständiger Proteine der Cytochrom c-Oxidase (COX1, COX2 und COX3) der mitochondrialen Atmungskette binden können. Es konnte gezeigt werden, dass die 5'-UTRs Signalsequenzen beinhalten, die die Translation der Proteine an ihrem Funktionsort in der inneren Mitochondrienmembran gewährleisten (Fox, 1996; Sanchirico et al., 1998; Fiori et al., 2003). Ein solches Modell wurde auch für das plastidäre Protein RBP63 aus *Chlamydomonas reinhardtii* vorgeschlagen (Ossenbühl et al., 2002). Dieses Protein ist in diesem Zusammenhang von besonderem Interesse, da es einige auffallende Parallelen zu HCF173 aufweist. RBP63 ist ein peripheres Membranprotein der Stromathylakoide und besitzt eine spezifische Affinität zur einer adeninreichen Region in der 5'-UTR der *PsbA*-RNA. Seine molekulare Masse von ca. 63 kDa entspricht in etwa dem berechneten Molekulargewicht von HCF173 (65,7 kDa mit plastidärer Transitsequenz) und das Protein wirkt in einem höhermolekularen Komplex von etwa 700 kDa (Ossenbühl et al., 2002). Recherchen in der EST-Datenbank von *Chlamydomonas reinhardtii* weisen darauf hin, dass in der Grünalge ein zu HCF173 homologes Protein existiert. Somit könnten HCF173 und RBP63 sich entsprechende Proteine sein. Allerdings muss beachtet werden, dass sich die Regulationsmechanismen der Genexpression in *Arabidopsis thaliana* und *Chlamydomonas reinhardtii* unterscheiden. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass chimäre Transkripte aus den 5'-UTRs der *PsbA*- bzw. *PsbB*-RNA aus *Arabidopsis thaliana* und dem bakteriellen *AadA* Gen, das Spectinomycinresistenz vermittelt, in *Chlamydomonas reinhardtii* nicht stabil sind (Nickelsen, 1999). Ein Vergleich der untranslatierten 5'-Regionen aus *Arabidopsis*

thaliana und *Chlamydomonas reinhardtii* unterstützt dieses Ergebnis, da sich die untranslatierten Regionen in ihrer Sequenz deutlich unterscheiden (Shen et al., 2001). Somit dürfen die Erkenntnisse über die *PsbA*-Expression nicht leichtfertig von einem Organismus auf den anderen übertragen werden.

An Erbse konnte dargelegt werden, dass die Akkumulation und Membranassoziation der *PsbA*-RNA unter Lichteinfluss ansteigt (Kettunen et al., 1997). Somit muss das Protein, das die Bindung des Transkriptes an die Membran herstellt, schon vor oder unmittelbar mit der Lichtgabe exprimiert und an seinen Bestimmungsort transportiert werden. Diese Bedingungen könnte HCF173 erfüllen, da zumindest sein Transkriptspiegel in einem Licht-/Dunkelrhythmus von je zwölf Stunden zu Beginn der Lichtphase sein maximales Niveau erreicht hat und somit eine gute Voraussetzung für eine schnelle und effektive Translation des Proteins gegeben ist (s. IV.2). HCF173 könnte durch seine Membranständigkeit zwar die Bindung der *PsbA*-RNA an die chloroplastidären Membranen gewährleisten, allerdings müsste ein zweites Protein das Transkript zu den Membranen transportieren. HCF173 kommt für diese Aufgabe nicht in Frage, da die Lokalisationsstudien für das Protein eine nahezu ausschließliche Assoziation mit dem plastidären Membransystem aufzeigten. Möglicherweise kommt für diese Funktion AtHIP1 in Betracht. Es könnte die *PsbA*-RNA im Stroma binden und das Transkript über Interaktion mit HCF173 an die Membran koppeln. Da allerdings die Lokalisation von AtHIP1 bisher noch nicht geklärt wurde, bleibt dies reine Spekulation.

Eine Funktion des HCF173-Komplexes während der Reifung der *PsbA*-RNA scheint relativ unwahrscheinlich. In *Chlamydomonas reinhardtii* muss die *PsbA*-RNA durch einen endonukleolytischen Schnitt in eine translatierbare Form überführt werden (Bruick und Mayfield, 1998). Im Gegensatz dazu vermittelt ein Schnitt in der 5'-UTR der Spinat-*PsbA*-RNA die Degradation der RNA. Produkte, die durch solche Schnitte entstehen, sind sehr instabil und blockieren die Translation (Klauff, 1995; Alexander et al., 1998). Für *Arabidopsis thaliana* wird ein ähnliches Szenario postuliert (Shen et al., 2001). Zwar konnte hier noch eine dritte Klasse von 5'-Enden nachgewiesen werden, allerdings sind die Transkripte mit diesen Enden ebenfalls nicht so abundant wie die längste Form (Shen et al., 2001). Somit kann davon ausgegangen werden, dass die 5'-Prozessierung der *PsbA*-RNA in höheren Pflanzen keinen stabilisierenden Effekt auf das Transkript ausübt und daher nicht als Funktion des HCF173-Komplexes in Betracht kommt. An der Reifung des 3'-Endes der *PsbA*-RNA ist die plastidäre PNPase beteiligt (Hayes et al., 1996). In Co-Supressor Linien von *Arabidopsis thaliana* wurde die Expression der PNPase verhindert. Als Folge davon fand nur eine verminderte 3'-Reifung der *PsbA*-RNA statt. Trotzdem akkumulierte das D1 Protein in diesen Linien in wildtypischen Mengen (Walter et al., 2002). Somit ist die 3'-Reifung der *PsbA*-RNA keine Voraussetzung für ihre Translation. Durch das Fehlen von HCF173 als Prozessierungsfaktor wäre also kein solch ausgeprägter Phänotyp erwartet worden, wie er für *hcf173* beobachtet wurde.

Zusammengefasst können also mehrere Funktionen für den HCF173-Komplex in Erwägung gezogen werden, die durchaus miteinander verknüpft sein können. Zum einen lässt sich vermuten, dass der HCF173-Komplex die Bindung der *PsbA*-RNA an die Thylakoidmembran vermittelt, so dass die Translation und die damit verbundene Insertion des D1-Proteins am Funktionsort gewährleistet sind. Weiterhin kommen Funktionen bei der Translationsinitiation

und der direkten Stabilisierung des *PsbA*-Transkriptes durch Bindung des HCF173-Komplexes an die untranslatierten Regionen in Betracht. Durch Bindung des Komplexes an die *PsbA*-RNA könnten Schnittstellen von Endonukleasen blockiert oder der Abbau der RNA durch Exonukleasen verhindert werden.

Um die Funktion von HCF173 bzw. des HCF173-Komplexes weiter einzugrenzen, sind weitere Versuche notwendig. So wäre interessant zu erfahren, wie HCF173, AtHIP1 und die *PsbA*-RNA miteinander wechselwirken, welches Protein von beiden die Bindung der Nukleinsäure bewerkstelligt, welche *cis*-Elemente der *PsbA*-RNA die Bindung vermitteln und welche weiteren Proteine an dem Komplex beteiligt sind. Zur Klärung dieser Aspekte wären weitere affinitätschromatographische Aufreinigungen, Hefe-Zwei-Hybrid-Assays, Überexpression von HCF173 und AtHIP1 in *E. coli* mit anschließenden Verzögerungsgelen und UV-Quervernetzung in Anwesenheit verschiedener *PsbA*-RNA-Fragmente hilfreich. Hinsichtlich der Funktion von AtHIP1 wäre die Charakterisierung einer T-DNA-Insertionslinie bezüglich des AtHIP1-Gens spannend. Sie würde einen Einblick gewährleisten, ob das Protein ebenfalls spezifisch in die Genexpression der *PsbA*-RNA eingreift oder ob das Protein eher eine allgemeinere Aufgabe erfüllt.

V. Zusammenfassung

Die plastidäre Genexpression wird hauptsächlich durch posttranskriptionelle Mechanismen reguliert. Dabei sind viele kernkodierte Faktoren an Prozessen wie der mRNA-Reifung durch 5'- und 3'-Prozessierung und Spleißen der Transkripte, der RNA-Stabilisierung durch Bindung an die untranslatierten Regionen der Transkripte sowie der Translation der mRNAs und der anschließenden Assemblierung der Untereinheiten zu funktionellen Komplexen der Thylakoidmembran beteiligt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde einer dieser Faktoren mit Hilfe der *hcf*-(high chlorophyll fluorescence-) Mutante *hcf173* eingehender charakterisiert.

Spektroskopische Analysen der Chlorophyll-Fluoreszenz-Induktion und der P700-Redoxkinetik zeigten, dass die Mutante einen spezifischen Defekt im Photosystem II aufweist und bestätigten damit vorausgegangene immunologische Analysen der Proteinspiegel plastidärer Membranproteine, die eine drastische Reduktion der Photosystem II-Untereinheiten aufzeigten (Dr. K. Meierhoff, pers. Mitteilung und Plücker et al., 2002). Mit Hilfe von *in vivo*-Proteinmarkierungsexperimenten und weiteren Northern-Blot-Analysen wurde nachgewiesen, dass die Mutante speziell das D1-Protein des Reaktionszentrums des Photosystems II kaum synthetisiert und die entsprechende mRNA in der Mutante nur wenig akkumuliert. In früheren Versuchen wurde bereits dargelegt, dass die *PsbA*-RNA, die für das D1-Protein kodiert, in *hcf173* instabil ist (Töller, 1999). Mit Hilfe von Translationsinhibitoren konnte nachgewiesen werden, dass der primäre Defekt, der durch die Mutation in *hcf173* hervorgerufen wird, auf Ebene der RNA-Stabilisierung und/oder den Prozessen der Translationsinitiation zu finden ist.

Durch Kartierung des mutanten Locus konnte das Gen *HCF173* isoliert und kloniert werden. Das kodierte Protein setzt sich aus 598 Aminosäuren zusammen und weist eine entfernte Verwandtschaft zu den Proteinen der SDR-(short chain dehydrogenase/reductase)-Superfamilie auf. Das Ergebnis der Kartierung wurde durch erfolgreiche Komplementation des *hcf173*-Phänotyps durch die *HCF173*-cDNA bzw. zwei Fusionsgene (AtHCF173-TAP und AtHCF173-tHA) bestätigt.

Die Komplementationslinien HCF173-cTAP und HCF173-ctHA erlaubten die Expression von HCF173 mit C-terminalem TAP-(Tandem Affinity Purification-) bzw. Triple-HA-(Hämagglutinin-) Etikett im Hintergrund des mutanten Genotyps und damit die Lokalisation von HCF173 im Chloroplasten, wo es peripher mit dem Membransystem des Organells assoziiert ist.

Durch Analyse von solubilisierten Proteinen der Chloroplastenmembranen aus HCF173-cTAP und HCF173-ctHA-Pflanzen im linearen Saccharose-Dichtegradienten und durch 2D-(Blue Native-/SDS-) Gelelektrophorese konnte nachgewiesen werden, dass HCF173 Teil eines möglicherweise größer als 669 kDa großen Komplexes ist. Durch Anti-HA-Affinitätschromatographie konnte das Protein AtHIP1 (*Arabidopsis thaliana* HCF173 interacting protein) (NP_566737) als Interaktor von HCF173-tHA und damit als weitere Untereinheit dieses Komplexes identifiziert werden. Durch Fällung von Nukleinsäuren aus

affinitätschromatographischen Eluaten, reverser Transkription, anschließender PCR und Southern-Analysen konnte nachgewiesen werden, dass der Komplex *PsbA*-Transkripte und somit die Ziel-RNA von HCF173 beinhaltet. Wie die Proteine des HCF173-Komplexes zueinander in Verbindung stehen, welches Protein die *PsbA*-RNA bindet und welche weiteren Komponenten dem HCF173-Komplex angehören, muss in zukünftigen Experimenten geklärt werden. Mögliche Funktionen des HCF173-Komplexes stellen die Initiation der Translation der *PsbA*-RNA, der Schutz der *PsbA*-RNA vor Nukleasen und/oder die Bindung des *PsbA*-Transkriptes an die Thylakoidmembran dar, um eine effiziente Synthese und Insertion des D1-Proteins während der *de novo* Biogenese und/oder der Reparatur des Photosystems II zu gewährleisten.

VI. Anhang

Tab. 8: Auflistung der verwendeten Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Verwendungszweck
16610-H2	CTC GTT CCA GTT CCA GAT CTC G	Sonde
16610-R1	CGA TGG GGA GAA TCA GGT GAT CGC	Sonde
16630-H2	CTT GTT GTG GCG TAT CTG TTG TTG G	Sonde
16630-R1	GGC TAC TCC GGT TTG TTC TTG CTG G	Sonde
16720-3'	CAC <u>GGA TCC</u> ATG CGT ATC AGA GCT TGA G ¹	Klonierung
16720-3xHA-R	CTG <u>ACC</u> ATG <u>GTG</u> TGT TCT TCT CAA GTA CAG ¹	Klonierung
16720-H1	CTA CTG TGC GAC TGC TCG GTC TAC G	Sonde
16720-H4	GTG GGA TTA GGA CGA CGA TCG C	Genotypisierung
16720-H5	CAC CCG AGG AGG ATA TGT TGA GTT G	cDNA
16720-H6	GGT AAT GTT CTT TGA GCT CCA GCC	Genotypisierung
16720-R1	CTC CCG AAC CAG TAC ACG ATA CCA G	Sonde, cDNA
16720-R4	GTA ATG CGT ATC AGA GCT TGA G	Genotypisierung
16720-R6	CTT GAC GGT GTA GCC ACG GAG C	T-DNA-Nachweis
16720-R10	CGG TTG TGT CCT GAA AGT AAG TTC C	Genotypisierung
16S-H	TGG GCG ACA CAC GTG CTA CAA TGG	Sonde
16S-R	TTC CAG TAC GGC TAC CTT GTT ACG	Sonde
3XHABamHI-R	CAG <u>TGG ATC CTC</u> AAG CGT AGT CAG GTA CGT CG ^{1,2}	Klonierung
3XHANcoI-H	GAC <u>TGC</u> CAT <u>GGT</u> ACC CAT ATG ACG TTC CAG AC ¹	Klonierung
Actin-H	TCA GAT GCC CAG AAG TCT TGT TCC	Real-Time-PCR
Actin-R	CCG TAC AGA TCC TTC CTG ATA TCC	Real-Time-PCR
At1g16720RT-H	GGC TAC ACC GTC AAG <u>GCA CT</u> ³	Real-Time-PCR
At1g16720RT-R	GAC GGT TCA CCC ACA TCT CC	Real-Time-PCR
AtpF-H	TCA GAA GAA CTG CGT GAA GGA GC	Sonde, RNA-Nachweis
AtpF-R	GTT GGA AAA CCC GTT CGC GGA C	Sonde, RNA-Nachweis
OligodT	TTT TTT TTT TTT TTT TTT	RT-PCR
PetB-H2	GTC TTG AGA TTC AGG CGA TTG C	Sonde, RNA-Nachweis
PetB-R2	GAC CAT CGA TGA ACT GAT CGG	Sonde, RNA-Nachweis
PEX-H	ACT GAC GTA AGG GAT GAC GCA C	T-DNA-Nachweis
pPC161LB	CCC ATT TGG ACG TGA ATG TAG ACA C	Genotypisierung
PsaC-H	TAG GAT GTA CTC AAT GTG TCC GAG C	Sonde, RNA-Nachweis
PsaC-R	AGG CGG ATT CAC ATC TCT TAC AAC C	Sonde, RNA-Nachweis
PsbA5'-H	CAA GCT CTC AAT TAT CTA CTT AGA G	Sonde, RNA-Nachweis
PsbA-R3	CAG TTA CAG AAG CGA CCC CAT AGG	Sonde, RNA-Nachweis
PsbB5'-H	GAA TTG TTC CAT TAT TAC TAA CAG	Sonde, RNA-Nachweis
PsbB5'-R	GTC TCC ACA TTG GAT CAA GAA CG	Sonde, RNA-Nachweis

¹ unterstrichene Basen geben Schnittstellen für Restriktionsenzyme an; ² fett gedruckte Basen geben ein eingefügtes Stopcodon an; ³ das Oligonukleotid erstreckt sich über die Exons 1 und 2 von At1g16720 (*HCF173*); unterstrichener Teil: Beginn von Exon 2

Fortsetzung Tab. 9: Auflistung der verwendeten Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Verwendungszweck
PsbE-H	AGC ACA GGA GAA CGT TCT TTT GC	Sonde, RNA-Nachweis
PsbE-R	TAT TAA TGG AAT GCC TTG TCG GC	Sonde, RNA-Nachweis
PsbH-HM	GAA TAC AAA ATA AGA TTT ATG GC	Sonde, RNA-Nachweis
PsbH-R	AAT ACC GCA AAT AGA GCC ATT GC	Sonde, RNA-Nachweis
RbcL-H	GAG TAA CTC CTC AAC CTG GAG TTC C	Sonde
RbcL-R	GGC CAT TAT CTC GGC AAT AAT GAG AC	Sonde
SNP039-1	TCG AGA GTC CCA GTA TGT GAA ATC	Kartierung
SNP039-2	CGT GTA TAA ACA TGC ACC TAT GTC	Kartierung
SNP062/072-1	AAA GGT GGC TCG GCC CAT TAG GCC	Kartierung
SNP062/072-3	GAC TGG AGA ACT CAA CTG CCA CCG	Kartierung
SNP156-1	TGA AGA TTA CAC GAC CAA GAA GTC	Kartierung
SNP156-3	ACA ATT CTT GTC GGG CAG ATA AAC	Kartierung
SNP333-1	TTC CAT CGA ACT CCT CCG TAA GTC	Kartierung
SNP333-2	CCA TCT GAT CAA AGA AGT CCG ATA TC	Kartierung
SNP340-1	GCA TGG ACA TTA CAC AAA TGG AAT G	Kartierung
SNP340-2	GAT TCC TAA CAT TAC AGA ACT GTA C	Kartierung
SNP365-1	CAT CTT CTA GAT TGG AAT TCG GAG G	Kartierung
SNP365-2	TGG TGT TAT GGA GTA TGG GCA CAT G	Kartierung
SNP397-1	CTC GTG CAT GAT ATT GAT GTA CGC	Kartierung
SNP397-2	AAC CCA CCT GCA GAA GAA CTA GTC	Kartierung
SNP612-1	AGC TTG GAT CGT ATA CGA AAG ATG	Kartierung
SNP612-2	GAT TGA TGA TTG ATT GAG AAT GAC	Kartierung
SNP623-2	GAG CGT GGA GTT GCA ACA GAT ACC	Kartierung
SNP623-3	GTT GTT GTT GTG CAT GGT AGA TCC	Kartierung
SNP631-1	TTA TCA GCA AAT TGC AAG GAT TAG	Kartierung
SNP631-3	CTT TGA CTC ACT TTC ACC ACT TTG TGG	Kartierung
SNP634-2	AAG CAA GCT CAT AGT TAG AGT AGC	Kartierung
SNP634-3	TAA TTG CAG TAG TGT GCT GGA TCC	Kartierung
SNP646-1	ACT TCT GCT AAG TCA GGG AGA GCC	Kartierung
SNP646-2	CAA GGC TCT ATG AAC CTT TCC ACC	Kartierung
SNP711/918-H1	CAT ACA GAA CAC ATA CAG CAG CCC CG	Kartierung
SNP711/918-R1	AGG ATG GTT CTG CTT CAT TCC TGA GC	Kartierung
SNP783-2	ACG GCT TAG AGT CGG TGG TGG TCC	Kartierung
SNP783-3	CCT CAT GTC GTA CGG TAC GGA GGC	Kartierung
SNP872-H2	CTT GAG GCT TTG CGA GAT GGT GAG C	Kartierung
SNP872-R1	ACA TGT GAG CAC ACT CAA AGG GAG G	Kartierung
T15D22-11	GTG TTT ATT ACG ACG TCG TAA CGC	Kartierung
T15D22-12	CAA AGT AGG CGA AGA TTA GCG TGC	Kartierung
TAP16720SmaI-H	TCA <u>TCC</u> CCG GAT GGT GGG TAG TAT TGT TGG ¹	Klonierung

¹ unterstrichene Basen geben Schnittstellen für Restriktionsenzyme an

Leseraster des Gens *HCF173* (*At1g16720*) aus *Arabidopsis thaliana*

```

[AS]      M  V  G  S  I  V  G  S  N  M  A  A  T  D  A  R  F  L
          ATG GTG GGT AGT ATT GTT GGC AGT AAC ATG GCT GCG ACT GAT GCG AGG TTT CTA
[bp]      9          18          27          36          45          54

      S  S  N  F  G  N  S  F  S  I  N  T  R  I  H  R  F  H  D  R
AGC TCG AAT TTT GGC AAC AGT TTC AGC ATC AAC ACC AGA ATT CAC AGA TTC CAT GAT CGC
          63          72          81          90          99          108

      S  Q  I  V  I  P  R  A  Q  S  S  S  S  P  S  P  S  P  P  S
TCC CAA ATC GTA ATC CCT AGG GCT CAA TCT TCT TCT TCT CCG TCT CCA TCT CCA CCC TCC
          123          132          141          150          159          168

      D  K  K  K  T  K  T  R  P  G  T  I  T  T  K  E  S  E  E  T
GAC AAG AAG AAG ACC AAA ACC CGA CCC GGA ACC ATA ACC ACT AAG GAG AGC GAA GAG ACG
          183          192          201          210          219          228

      V  A  K  K  L  D  V  A  P  P  S  P  Q  S  P  P  S  P  P  T
GTT GCG AAG AAG CTC GAC GTT GCT CCG CCT TCG CCT CAA TCA CCA CCG TCT CCG CCT ACA
          243          252          261          270          279          288

      L  K  L  D  D  V  N  P  V  G  L  G  R  R  S  R  Q  I  F  D
CTG AAG TTG GAC GAT GTG AAT CCT GTG GGA TTA GGA CGA CGA TCG CGG CAG ATC TTC GAC
          303          312          321          330          339          348

      E  V  W  R  K  F  S  G  L  G  Q  M  S  R  T  T  R  P  D  E
GAG GTG TGG CGG AAA TTC TCT GGA TTA GGT CAG ATG TCG AGG ACA ACC CGA CCC GAT GAG
          363          372          381          390          399          408

      Q  E  T  L  D  S  L  L  I  R  E  G  P  M  C  E  F  A  V  P
CAA GAG ACT CTT GAT AGT CTA CTC ATT AGA GAA GGA CCT ATG TGT GAG TTT GCT GTT CCC
          423          432          441          450          459          468

      G  A  Q  N  V  T  V  L  V  V  G  A  T  S  R  I  G  R  I  V
GGC GCT CAA AAC GTT ACC GTT TTA GTC GTC GGA GCT ACT AGT AGA ATC GGT CGT ATC GTT
          483          492          501          510          519          528

      V  R  K  L  M  L  R  G  Y  T  V  K  A  L  V  R  K  Q  D  E
GTC CGT AAA CTC ATG CTC CGT GGC TAC ACC GTC AAG GCA CTG GTG AGG AAA CAA GAT GAG
          543          552          561          570          579          588

      E  V  M  S  M  L  P  R  S  V  D  I  V  V  G  D  V  G  E  P
GAA GTG ATG AGT ATG TTG CCA AGG TCA GTG GAT ATT GTT GTT GGA GAT GTG GGT GAA CCG
          603          612          621          630          639          648

      S  T  L  K  S  A  V  E  S  C  S  K  I  I  Y  C  A  T  A  R
TCA ACG CTC AAA TCC GCT GTT GAA AGC TGC AGC AAG ATC ATC TAC TGT GCG ACT GCT CGG
          663          672          681          690          699          708

      S  T  I  T  A  D  L  T  R  V  D  H  L  G  V  Y  N  L  T  K
TCT ACG ATT ACT GCA GAC CTT ACG CGG GTT GAT CAC TTG GGT GTT TAT AAC CTC ACC AAG
          723          732          741          750          759          768

```

Fortsetzung Leseraster des Gens *HCF173* (*At1g16720*) aus *Arabidopsis thaliana*

A F Q D Y N N R L A Q L R A G K S S K S
 GCT TTT CAG GAT TAC AAT AAC AGA CTA GCG CAA TTA AGG GCG GGT AAA AGC AGC AAA AGC
 783 792 801 810 819 828

K L L L A K F K S A E S L D G W E I R Q
 AAG CTT CTA TTA GCT AAG TTC AAG TCA GCT GAG TCA CTT GAT GGT TGG GAA ATT CGT CAA
 843 852 861 870 879 888

G T Y F Q D T T A S K Y D G G M D A K F
 GGA ACT TAC TTT CAG GAC ACA ACC GCT TCC AAA TAT GAT GGT GGG ATG GAT GCT AAG TTT
 903 912 921 930 939 948

E F T E T E R A E F S G Y V F T R G G Y
 GAG TTC ACT GAA ACT GAG AGA GCT GAG TTT TCA GGT TAT GTT TTC ACC CGA GGA GGA TAT
 963 972 981 990 999 1008

V E L S K K L S L P L G T T L D R Y E G
 GTT GAG TTG TCG AAG AAA CTT TCA CTT CCA TTG GGT ACC ACT CTT GAC AGG TAC GAA GGC
 1023 1032 1041 1050 1059 1068

L V L S V G G N G R S Y V V I L E A G P
 TTA GTT CTT TCT GTT GGT GGG AAT GGA AGA TCC TAT GTT GTA ATC CTT GAA GCT GGT CCA
 1083 1092 1101 1110 1119 1128

S S D M S Q S K Q Y F A R I S T K A G F
 TCA TCA GAT ATG TCT CAG AGC AAA CAG TAT TTC GCT AGG ATC AGT ACC AAA GCA GGG TTT
 1143 1152 1161 1170 1179 1188

C R V R V P F S A F R P V N P E D P P L
 TGT CGG GTA AGG GTG CCA TTT TCA GCT TTT CGA CCG GTC AAC CCA GAA GAT CCA CCG CTA
 1203 1212 1221 1230 1239 1248

D P F L V H T L T I R F E P K R Q R P V
 GAT CCA TTT CTT GTT CAC ACA TTG ACA ATA CGC TTT GAG CCT AAA AGA CAG AGG CCT GTT
 1263 1272 1281 1290 1299 1308

D G L A G A Q Q D L R S F S L V F E Y I
 GAT GGA CTT GCT GGT GCG CAA CAA GAT TTG AGA AGT TTT AGC CTT GTA TTT GAG TAC ATA
 1323 1332 1341 1350 1359 1368

K A L P A G Q E T D F I L V S C T G S G
 AAA GCT TTG CCT GCG GGT CAA GAA ACA GAC TTT ATT CTG GTA TCG TGT ACT GGT TCG GGA
 1383 1392 1401 1410 1419 1428

V E A N R R E Q V L K A K R A G E D S L
 GTA GAA GCC AAC AGA AGG GAG CAA GTG TTG AAA GCT AAG AGG GCT GGT GAA GAT TCT TTA
 1443 1452 1461 1470 1479 1488

R R S G L G Y T I I R P G P L K E E P G
 AGG AGA TCA GGC CTT GGA TAC ACA ATC ATT CGT CCT GGT CCC TTG AAG GAG GAA CCA GGC
 1503 1512 1521 1530 1539 1548

Fortsetzung Leseraster des Gens *HCF173* (At1g16720) aus *Arabidopsis thaliana*

G Q R A L I F D Q G N R I S Q G I S C A
GGG CAA CGA GCT CTG ATA TTT GAT CAA GGA AAC AGA ATT TCT CAG GGC ATT AGT TGC GCG
1563 1572 1581 1590 1599 1608

D V A D I C V K A L H D S T A R N K S F
GAT GTG GCT GAT ATA TGT GTC AAG GCA CTG CAC GAT TCA ACC GCC AGA AAC AAA AGC TTT
1623 1632 1641 1650 1659 1668

D V C H E Y V A E Q G I E L Y E L V A H
GAT GTT TGC CAT GAA TAC GTT GCT GAG CAA GGA ATA GAA CTC TAT GAG CTG GTG GCT CAT
1683 1692 1701 1710 1719 1728

L P D K A N N Y L T P A L S V L E K N T
TTG CCA GAC AAG GCG AAC AAC TAT CTG ACT CCG GCT TTA TCT GTA CTT GAG AAG AAC ACA
1743 1752 1761 1770 1779 1788

*
TGA
1797

VII. Literatur

- Alexander, C., Faber, N. und Klaff, P.** (1998). Characterization of protein-binding to the spinach chloroplast psbA mRNA 5' untranslated region. *Nucleic Acids Res* **26**, 2265-2272.
- Allen, J.F.** (2003). The function of genomes in bioenergetic organelles. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **358**, 19-38.
- Allison, L.A.** (2000). The role of sigma factors in plastid transcription. *Biochimie* **82**, 537-548.
- Allison, L.A., Simon, L.D. und Maliga, P.** (1996). Deletion of rpoB reveals a second distinct transcription system in plastids of higher plants. *Embo J* **15**, 2802-2809.
- Altschul, S.F., Boguski, M.S., Gish, W. und Wootton, J.C.** (1994). Issues in searching molecular sequence databases. *Nat Genet* **6**, 119-129.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. und Lipman, D.J.** (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**, 3389-3402.
- Anderson, J.M. und Boardman, N.K.** (1966). Fractionation of the photochemical systems of photosynthesis. I. Chlorophyll contents and photochemical activities of particles isolated from spinach chloroplasts. *Biochim Biophys Acta* **112**, 403-421.
- Ashburner, M.** (1990). *Drosophila: A Laboratory Handbook*. (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Baginsky, S., Tiller, K., Pfannschmidt, T. und Link, G.** (1999). PTK, the chloroplast RNA polymerase-associated protein kinase from mustard (*Sinapis alba*), mediates redox control of plastid in vitro transcription. *Plant Mol Biol* **39**, 1013-1023.
- Baginsky, S., Shteiman-Kotler, A., Liveanu, V., Yehudai-Resheff, S., Bellaoui, M., Settlage, R.E., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Schuster, G. und Gruissem, W.** (2001). Chloroplast PNPase exists as a homo-multimer enzyme complex that is distinct from the *Escherichia coli* degradosome. *Rna* **7**, 1464-1475.
- Baker, K.E. und Parker, R.** (2004). Nonsense-mediated mRNA decay: terminating erroneous gene expression. *Curr Opin Cell Biol* **16**, 293-299.
- Baker, M.E., Grundy, W.N. und Elkan, C.P.** (1998). Spinach CSP41, an mRNA-binding protein and ribonuclease, is homologous to nucleotide-sugar epimerases and hydroxysteroid dehydrogenases. *Biochem Biophys Res Commun* **248**, 250-254.
- Barkan, A.** (1993). Nuclear Mutants of Maize with Defects in Chloroplast Polysome Assembly Have Altered Chloroplast RNA Metabolism. *Plant Cell* **5**, 389-402.
- Barkan, A. und Goldschmidt-Clermont, M.** (2000). Participation of nuclear genes in chloroplast gene expression. *Biochimie* **82**, 559-572.
- Barkan, A., Walker, M., Nolasco, M. und Johnson, D.** (1994). A nuclear mutation in maize blocks the processing and translation of several chloroplast mRNAs and provides evidence for the differential translation of alternative mRNA forms. *Embo J* **13**, 3170-3181.
- Barnes, D., Cohen, A., Bruick, R.K., Kantardjieff, K., Fowler, S., Efuet, E. und Mayfield, S.P.** (2004). Identification and characterization of a novel RNA binding protein that associates with the 5'-untranslated region of the chloroplast psbA mRNA. *Biochemistry* **43**, 8541-8550.
- Bassi, R. und Simpson, D.** (1987). Chlorophyll-protein complexes of barley photosystem I. *Eur J Biochem* **163**, 221-230.

- Bateman, A., Coin, L., Durbin, R., Finn, R.D., Hollich, V., Griffiths-Jones, S., Khanna, A., Marshall, M., Moxon, S., Sonnhammer, E.L., Studholme, D.J., Yeats, C. und Eddy, S.R.** (2004). The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res* **32**, D138-141.
- Bechtold, N., Ellis, J. und Pelletier, G.** (1993). In planta *Agrobacterium*-mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *C. R. Acad. Sci.* **316**, 1194-1199.
- Bell, C.J. und Ecker, J.R.** (1994). Assignment of 30 microsatellite loci to the linkage map of *Arabidopsis*. *Genomics* **19**, 137-144.
- Ben-Shem, A., Frolow, F. und Nelson, N.** (2003). Crystal structure of plant photosystem I. *Nature* **426**, 630-635.
- Birnboim, H.C. und Doly, J.** (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**, 1513-1523.
- Blowers, A.D., Klein, U., Ellmore, G.S. und Bogorad, L.** (1993). Functional in vivo analyses of the 3' flanking sequences of the *Chlamydomonas* chloroplast *rbcl* and *psaB* genes. *Mol Gen Genet* **238**, 339-349.
- Bock, R., Kossel, H. und Maliga, P.** (1994). Introduction of a heterologous editing site into the tobacco plastid genome: the lack of RNA editing leads to a mutant phenotype. *Embo J* **13**, 4623-4628.
- Bogsch, E.G., Sargent, F., Stanley, N.R., Berks, B.C., Robinson, C. und Palmer, T.** (1998). An essential component of a novel bacterial protein export system with homologues in plastids and mitochondria. *J Biol Chem* **273**, 18003-18006.
- Bollenbach, T.J. und Stern, D.B.** (2003a). Secondary structures common to chloroplast mRNA 3'-untranslated regions direct cleavage by CSP41, an endoribonuclease belonging to the short chain dehydrogenase/reductase superfamily. *J Biol Chem* **278**, 25832-25838.
- Bollenbach, T.J. und Stern, D.B.** (2003b). Divalent metal-dependent catalysis and cleavage specificity of CSP41, a chloroplast endoribonuclease belonging to the short chain dehydrogenase/reductase superfamily. *Nucleic Acids Res* **31**, 4317-4325.
- Bollenbach, T.J., Tatman, D.A. und Stern, D.B.** (2003). CSP41a, a multifunctional RNA-binding protein, initiates mRNA turnover in tobacco chloroplasts. *Plant J* **36**, 842-852.
- Bollenbach, T.J., Schuster, G. und Stern, D.B.** (2004). Cooperation of endo- and exoribonucleases in chloroplast mRNA turnover. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **78**, 305-337.
- Boni, I.V., Isaeva, D.M., Musychenko, M.L. und Tzareva, N.V.** (1991). Ribosome-messenger recognition: mRNA target sites for ribosomal protein S1. *Nucleic Acids Res* **19**, 155-162.
- Boschetti, A., Breidenbach, E. und Blätter, R.** (1990). Control of protein formation in chloroplasts. *Plant Science* **68**, 131-149.
- Bouche, N., Yellin, A., Snedden, W.A. und Fromm, H.** (2005). Plant-Specific Calmodulin-Binding Proteins. *Annu Rev Plant Biol* **56**, 435-466.
- Boudreau, E., Nickelsen, J., Lemaire, S.D., Ossenbühl, F. und Rochaix, J.D.** (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. und Mayfield, S.P.** (1998). Processing of the *psbA* 5' untranslated region in *Chlamydomonas reinhardtii* depends upon factors mediating ribosome association. *J Cell Biol* **143**, 1145-1153.

- Bycroft, M., Hubbard, T.J., Proctor, M., Freund, S.M. und Murzin, A.G.** (1997). The solution structure of the S1 RNA binding domain: a member of an ancient nucleic acid-binding fold. *Cell* **88**, 235-242.
- Calvin, M.** (1962). The path of carbon in photosynthesis. *Science* **135**, 879-889.
- Chang, C.C., Sheen, J., Bligny, M., Niwa, Y., Lerbs-Mache, S. und Stern, D.B.** (1999). Functional analysis of two maize cDNAs encoding T7-like RNA polymerases. *Plant Cell* **11**, 911-926.
- Chekanova, J.A., Dutko, J.A., Mian, I.S. und Belostotsky, D.A.** (2002). Arabidopsis thaliana exosome subunit AtRrp4p is a hydrolytic 3'→5' exonuclease containing S1 and KH RNA-binding domains. *Nucleic Acids Res* **30**, 695-700.
- Chory, J., Nagpal, P. und Peto, C.A.** (1991). Phenotypic and Genetic Analysis of det2, a New Mutant That Affects Light-Regulated Seedling Development in Arabidopsis. *Plant Cell* **3**, 445-459.
- Cline, K. und Mori, H.** (2001). Thylakoid DeltapH-dependent precursor proteins bind to a cpTatC-Hcf106 complex before Tha4-dependent transport. *J Cell Biol* **154**, 719-729.
- Clough, S.J. und Bent, A.F.** (1998). Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. *Plant J* **16**, 735-743.
- Company, M., Arenas, J. und Abelson, J.** (1991). Requirement of the RNA helicase-like protein PRP22 for release of messenger RNA from spliceosomes. *Nature* **349**, 487-493.
- Cuff, J.A. und Barton, G.J.** (2000). Application of multiple sequence alignment profiles to improve protein secondary structure prediction. *Proteins* **40**, 502-511.
- Danon, A. und Mayfield, S.P.** (1991). Light regulated translational activators: identification of chloroplast gene specific mRNA binding proteins. *Embo J* **10**, 3993-4001.
- Danon, A. und Mayfield, S.P.** (1994). Light-regulated translation of chloroplast messenger RNAs through redox potential. *Science* **266**, 1717-1719.
- Dauvillee, D., Stampacchia, O., Girard-Bascou, J. und Rochaix, J.D.** (2003). Tab2 is a novel conserved RNA binding protein required for translation of the chloroplast psaB mRNA. *Embo J* **22**, 6378-6388.
- de Vitry, C., Olive, J., Drapier, D., Recouvreur, M. und Wollman, F.A.** (1989). Posttranslational events leading to the assembly of photosystem II protein complex: a study using photosynthesis mutants from *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Cell Biol* **109**, 991-1006.
- Deng, X.W. und Gruissem, W.** (1987). Control of plastid gene expression during development: the limited role of transcriptional regulation. *Cell* **49**, 379-387.
- Douglas, S.E.** (1998). Plastid evolution: origins, diversity, trends. *Curr Opin Genet Dev* **8**, 655-661.
- Drager, R.G., Higgs, D.C., Kindle, K.L. und Stern, D.B.** (1999). 5' to 3' exoribonucleolytic activity is a normal component of chloroplast mRNA decay pathways. *Plant J* **19**, 521-531.
- Draper, D.E. und Reynaldo, L.P.** (1999). RNA binding strategies of ribosomal proteins. *Nucleic Acids Res* **27**, 381-388.
- Edhofer, I., Muhlbauer, S.K. und Eichacker, L.A.** (1998). Light regulates the rate of translation elongation of chloroplast reaction center protein D1. *Eur J Biochem* **257**, 78-84.
- Edwards, K., Johnstone, C. und Thompson, C.** (1991). A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Res* **19**, 1349.
- Emanuel, C., Weihe, A., Graner, A., Hess, W.R. und Borner, T.** (2004). Chloroplast development affects expression of phage-type RNA polymerases in barley leaves. *Plant J* **38**, 460-472.

- Emanuelsson, O., Nielsen, H. und von Heijne, G.** (1999). ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites. *Protein Sci* **8**, 978-984.
- Felder, S., Meierhoff, K., Sane, A.P., Meurer, J., Driemel, C., Plücken, H., Klaff, P., Stein, B., Bechtold, N. und Westhoff, P.** (2001). The nucleus-encoded HCF107 gene of *Arabidopsis* provides a link between intercistronic RNA processing and the accumulation of translation-competent psbH transcripts in chloroplasts. *Plant Cell* **13**, 2127-2141.
- Ferreira, K.N., Iverson, T.M., Maghlaoui, K., Barber, J. und Iwata, S.** (2004). Architecture of the photosynthetic oxygen-evolving center. *Science* **303**, 1831-1838.
- Filling, C., Berndt, K.D., Benach, J., Knapp, S., Prozorovski, T., Nordling, E., Ladenstein, R., Jornvall, H. und Oppermann, U.** (2002). Critical residues for structure and catalysis in short-chain dehydrogenases/reductases. *J Biol Chem* **277**, 25677-25684.
- Fiori, A., Mason, T.L. und Fox, T.D.** (2003). Evidence that synthesis of the *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrially encoded ribosomal protein Var1p may be membrane localized. *Eukaryot Cell* **2**, 651-653.
- Fong, C.L., Lentz, A. und Mayfield, S.P.** (2000). Disulfide bond formation between RNA binding domains is used to regulate mRNA binding activity of the chloroplast poly(A)-binding protein. *J Biol Chem* **275**, 8275-8278.
- Fox, T.D.** (1996). Genetics of mitochondrial translation. In *Translational control*, J.W.B. Hershey, M.B. Matthews und N. Sonenberg, eds (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Press), pp. 733-758.
- Franzetti, B., Carol, P. und Mache, R.** (1992a). Characterization and RNA-binding properties of a chloroplast S1-like ribosomal protein. *J Biol Chem* **267**, 19075-19081.
- Franzetti, B., Zhou, D.X. und Mache, R.** (1992b). Structure and expression of the nuclear gene coding for the plastid CS1 ribosomal protein from spinach. *Nucleic Acids Res* **20**, 4153-4157.
- Fujiki, Y., Hubbard, A.L., Fowler, S. und Lazarow, P.B.** (1982). Isolation of intracellular membranes by means of sodium carbonate treatment: application to endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* **93**, 97-102.
- Fujiwara, M., Nagashima, A., Kanamaru, K., Tanaka, K. und Takahashi, H.** (2000). Three new nuclear genes, sigD, sigE and sigF, encoding putative plastid RNA polymerase sigma factors in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett* **481**, 47-52.
- Genty, B., Harbinson, J., Briantis, J.M. und Baker, N.R.** (1989). The relationship between non-photochemical quenching and chlorophyll fluorescence and the rate of photosystem II chemistry in leaves. *Photosynth Res* **25**, 249-257.
- Girard-Bascou, J., Pierre, Y. und Drapier, D.** (1992). A nuclear mutation affects the synthesis of the chloroplast psbA gene production *Chlamydomonas reinhardtii*. *Curr Genet* **22**, 47-52.
- Goldschmidt-Clermont, M.** (1998). Coordination of nuclear and chloroplast gene expression in plant cells. *Int Rev Cytol* **177**, 115-180.
- Greene, E.A., Codomo, C.A., Taylor, N.E., Henikoff, J.G., Till, B.J., Reynolds, S.H., Enns, L.C., Burtner, C., Johnson, J.E., Odden, A.R., Comai, L. und Henikoff, S.** (2003). Spectrum of chemically induced mutations from a large-scale reverse-genetic screen in *Arabidopsis*. *Genetics* **164**, 731-740.
- Gribskov, M.** (1992). Translational initiation factors IF-1 and eIF-2 alpha share an RNA-binding motif with prokaryotic ribosomal protein S1 and polynucleotide phosphorylase. *Gene* **119**, 107-111.
- Gross, C.A., Chan, C., Dombroski, A., Gruber, T., Sharp, M., Tupy, J. und Young, B.** (1998). The functional and regulatory roles of sigma factors in transcription. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **63**, 141-155.

- Gualerzi, C.O. und Pon, C.L.** (1990). Initiation of mRNA translation in prokaryotes. *Biochemistry* **29**, 5881-5889.
- Hajdukiewicz, P.T., Allison, L.A. und Maliga, P.** (1997). The two RNA polymerases encoded by the nuclear and the plastid compartments transcribe distinct groups of genes in tobacco plastids. *Embo J* **16**, 4041-4048.
- Hakimi, M.A., Privat, I., Valay, J.G. und Lerbs-Mache, S.** (2000). Evolutionary conservation of C-terminal domains of primary sigma(70)-type transcription factors between plants and bacteria. *J Biol Chem* **275**, 9215-9221.
- Hanahan, D., Jessee, J. und Bloom, F.R.** (1991). Plasmid transformation of *Escheria coli* and other bacteria. *Meth. Enzymol.* **204**, 63-113.
- Harris, E.H., Boynton, J.E. und Gillham, N.W.** (1994). Chloroplast ribosomes and protein synthesis. *Microbiol Rev* **58**, 700-754.
- Hayes, R., Kudla, J. und Gruissem, W.** (1999). Degrading chloroplast mRNA: the role of polyadenylation. *Trends Biochem Sci* **24**, 199-202.
- Hayes, R., Kudla, J., Schuster, G., Gabay, L., Maliga, P. und Gruissem, W.** (1996). Chloroplast mRNA 3'-end processing by a high molecular weight protein complex is regulated by nuclear encoded RNA binding proteins. *Embo J* **15**, 1132-1141.
- Hedtke, B., Borner, T. und Weihe, A.** (1997). Mitochondrial and chloroplast phage-type RNA polymerases in Arabidopsis. *Science* **277**, 809-811.
- Hentze, M.W.** (1994). Enzymes as RNA-binding proteins: a role for (di)nucleotide-binding domains? *Trends Biochem Sci* **19**, 101-103.
- Herrmann, R.G., Westhoff, P., Alt, J., Tittgen, J. und Nelson, N.** (1985). Thylakoid membrane proteins and their genes. In: van Vloten-Doting, L, Groot, GSP and Hall, TC (EDs) *Molecular form and function of the plant genome*. Plenum Publishing Corporation, New York, 233-256.
- Hess, W.R. und Börner, T.** (1999). Organellar RNA polymerases of higher plants. *Int Rev Cytol* **190**, 1-59.
- Higgs, D.C., Shapiro, R.S., Kindle, K.L. und Stern, D.B.** (1999). Small cis-acting sequences that specify secondary structures in a chloroplast mRNA are essential for RNA stability and translation. *Mol Cell Biol* **19**, 8479-8491.
- Hirose, T. und Sugiura, M.** (1996). Cis-acting elements and trans-acting factors for accurate translation of chloroplast psbA mRNAs: development of an in vitro translation system from tobacco chloroplasts. *Embo J* **15**, 1687-1695.
- Hirose, T. und Sugiura, M.** (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. und Sugiura, M.** (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**, 1144-1152.
- Hirose, T., Kusumegi, T., Tsudzuki, T. und Sugiura, M.** (1999). RNA editing sites in tobacco chloroplast transcripts: editing as a possible regulator of chloroplast RNA polymerase activity. *Mol Gen Genet* **262**, 462-467.
- Hoch, B., Maier, R.M., Appel, K., Igloi, G.L. und Kossel, H.** (1991). Editing of a chloroplast mRNA by creation of an initiation codon. *Nature* **353**, 178-180.

Holloway, S.P. und Herrin, D.L. (1998). Processing of a composite large subunit rRNA. Studies with chlamydomonas mutants deficient in maturation of the 23s-like rRNA. *Plant Cell* **10**, 1193-1206.

Holmes, D.S. und Quigley, M. (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal Biochem* **114**, 193-197.

Horlitz, M. und Klaff, P. (2000). Gene-specific trans-regulatory functions of magnesium for chloroplast mRNA stability in higher plants. *J Biol Chem* **275**, 35638-35645.

Horton, P. (Manuskript in Vorbereitung).

Hu, G. (1993). DNA polymerase-catalyzed addition of nontemplated extra nucleotides to the 3' end of a DNA fragment. *DNA Cell Biol* **12**, 763-770.

Hynds, P.J., Robinson, D. und Robinson, C. (1998). The sec-independent twin-arginine translocation system can transport both tightly folded and malfolded proteins across the thylakoid membrane. *J Biol Chem* **273**, 34868-34874.

Igloi, G.L. und Kössel, H. (1992). The transcriptional apparatus of chloroplasts. *Crit. Rev. Plant Sci.* **10**, 525-558.

Ikeda, T.M. und Gray, M.W. (1999). Identification and characterization of T3/T7 bacteriophage-like RNA polymerase sequences in wheat. *Plant Mol Biol* **40**, 567-578.

Ishizaki, Y., Tsunoyama, Y., Hatano, K., Ando, K., Kato, K., Shinmyo, A., Kobori, M., Takeba, G., Nakahira, Y. und Shiina, T. (2005). A nuclear-encoded sigma factor, Arabidopsis SIG6, recognizes sigma-70 type chloroplast promoters and regulates early chloroplast development in cotyledons. *Plant J* **42**, 133-144.

Jarvis, P. und Soll, J. (2002). Toc, tic, and chloroplast protein import. *Biochim Biophys Acta* **1590**, 177-189.

Jenkins, B.D., Kulhanek, D.J. und Barkan, A. (1997). Nuclear mutations that block group II RNA splicing in maize chloroplasts reveal several intron classes with distinct requirements for splicing factors. *Plant Cell* **9**, 283-296.

Jornvall, H., Persson, B., Krook, M., Atrian, S., Gonzalez-Duarte, R., Jeffery, J. und Ghosh, D. (1995). Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR). *Biochemistry* **34**, 6003-6013.

Kallberg, Y., Oppermann, U., Jörnvall, H. und Persson, B. (2002). Short-chain dehydrogenases/reductases (SDRs). *Eur J Biochem* **269**, 4409-4417.

Kallia-Raftopoulos, S. und Kalpaxis, D.L. (1999). Slow sequential conformational changes in Escherichia coli ribosomes induced by lincomycin: kinetic evidence. *Mol Pharmacol* **56**, 1042-1046.

Kanamaru, K. und Tanaka, K. (2004). Roles of chloroplast RNA polymerase sigma factors in chloroplast development and stress response in higher plants. *Biosci Biotechnol Biochem* **68**, 2215-2223.

Kanamaru, K., Fujiwara, M., Seki, M., Katagiri, T., Nakamura, M., Mochizuki, N., Nagatani, A., Shinozaki, K., Tanaka, K. und Takahashi, H. (1999). Plastidic RNA polymerase sigma factors in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol* **40**, 832-842.

Kaneko, T., Sato, S., Kotani, H., Tanaka, A., Asamizu, E., Nakamura, Y., Miyajima, N., Hirose, M., Sugiura, M., Sasamoto, S., Kimura, T., Hosouchi, T., Matsuno, A., Muraki, A., Nakazaki, N., Naruo, K., Okumura, S., Shimpo, S., Takeuchi, C., Wada, T., Watanabe, A., Yamada, M., Yasuda, M. und Tabata, S. (1996). Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium Synechocystis sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *DNA Res* **3**, 109-136.

- Kang, D., Gho, Y.S., Suh, M. und Kang, C.** (2002). Highly sensitive and fast protein detection with Coomassie Brilliant Blue in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Bull. Korean Chem. Soc.* **23**, 1511-1512.
- Kestermann, M., Neukirchen, S., Kloppstech, K. und Link, G.** (1998). Sequence and expression characteristics of a nuclear-encoded chloroplast sigma factor from mustard (*Sinapis alba*). *Nucleic Acids Res* **26**, 2747-2753.
- Kettunen, R., Pursiheimo, S., Rintamaki, E., Van Wijk, K.J. und Aro, E.M.** (1997). Transcriptional and translational adjustments of *psbA* gene expression in mature chloroplasts during photoinhibition and subsequent repair of photosystem II. *Eur J Biochem* **247**, 441-448.
- Kim, J. und Mayfield, S.P.** (1997). Protein disulfide isomerase as a regulator of chloroplast translational activation. *Science* **278**, 1954-1957.
- Kim, J. und Mayfield, S.P.** (2002). The active site of the thioredoxin-like domain of chloroplast protein disulfide isomerase, RB60, catalyzes the redox-regulated binding of chloroplast poly(A)-binding protein, RB47, to the 5' untranslated region of *psbA* mRNA. *Plant Cell Physiol* **43**, 1238-1243.
- Kim, J., Klein, P.G. und Mullet, J.E.** (1994). Vir-115 gene product is required to stabilize D1 translation intermediates in chloroplasts. *Plant Mol Biol* **25**, 459-467.
- Kim, M., Christopher, D.A. und Mullet, J.E.** (1993). Direct evidence for selective modulation of *psbA*, *rpoA*, *rbcL* and 16S RNA stability during barley chloroplast development. *Plant Mol Biol* **22**, 447-463.
- Kirk, J.T.** (1971). Chloroplast structure and biogenesis. *Annu Rev Biochem* **40**, 161-196.
- Klaff, P.** (1995). mRNA decay in spinach chloroplasts: *psbA* mRNA degradation is initiated by endonucleolytic cleavages within the coding region. *Nucleic Acids Res* **23**, 4885-4892.
- Klaff, P. und Gruißem, W.** (1991). Changes in Chloroplast mRNA Stability during Leaf Development. *Plant Cell* **3**, 517-529.
- Klaff, P., Mundt, S.M. und Steger, G.** (1997). Complex formation of the spinach chloroplast *psbA* mRNA 5' untranslated region with proteins is dependent on the RNA structure. *Rna* **3**, 1468-1479.
- Klein, R.R. und Mullet, J.E.** (1987). Control of gene expression during higher plant chloroplast biogenesis. Protein synthesis and transcript levels of *psbA*, *psaA-psaB*, and *rbcL* in dark-grown and illuminated barley seedlings. *J Biol Chem* **262**, 4341-4348.
- Klein, R.R., Mason, H.S. und Mullet, J.E.** (1988). Light-regulated translation of chloroplast proteins. I. Transcripts of *psaA-psaB*, *psbA*, and *rbcL* are associated with polysomes in dark-grown and illuminated barley seedlings. *J Cell Biol* **106**, 289-301.
- Klughammer, C. und Schreiber, U.** (1998). Measuring P700 absorbance changes in the near infrared spectral region with a dual wavelength pulse modulation system. (Dordrecht: Kluwer Academic Publishers).
- Koncz, C., Martini, N., Szabados, L., Hrouda, M., Bachmair, A. und Schell, J.** (1994). Specialized vectors for gene tagging and expression studies. In Gelvin, S.B. and Schillerpoort, R.A. (eds), *Plant Molecular Biology Manual Vol B2 Kluwer Academic Publishers, Dordrecht*, 1-22.
- Konieczny, A. und Ausubel, F.M.** (1993). A procedure for mapping Arabidopsis mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. *Plant J* **4**, 403-410.
- Kotera, E., Tasaka, M. und Shikanai, T.** (2005). A pentatricopeptide repeat protein is essential for RNA editing in chloroplasts. *Nature* **433**, 326-330.
- Krause, G.H. und Weis, E.** (1991). Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The basics. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **42**, 313-349.

- Kroll, D., Streubel, M. und Westhoff, P.** (1999). A plastid sigma factor sequence from the C4 monocot *Sorghum bicolor*. *Plant Biol.* **1**, 180-186.
- Kroll, D., Meierhoff, K., Bechtold, N., Kinoshita, M., Westphal, S., Vothknecht, U.C., Soll, J. und Westhoff, P.** (2001). VIPP1, a nuclear gene of *Arabidopsis thaliana* essential for thylakoid membrane formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 4238-4242.
- Kuchka, M., Mayfield, S. und Rochaix, J.D.** (1988). Nuclear mutations specifically affect the synthesis and/or degradation of the chloroplast-encoded D2 polypeptide of photosystem II in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Embo J* **7**, 319-324.
- Kudla, J., Hayes, R. und Grissem, W.** (1996). Polyadenylation accelerates degradation of chloroplast mRNA. *Embo J* **15**, 7137-7146.
- Kusumi, K., Yara, A., Mitsui, N., Tozawa, Y. und Iba, K.** (2004). Characterization of a rice nuclear-encoded plastid RNA polymerase gene OsRpoTp. *Plant Cell Physiol* **45**, 1194-1201.
- Kuwano, M., Ono, M., Endo, H., Hori, K., Nakamura, K., Hirota, Y. und Ohnishi, Y.** (1977). Gene affecting longevity of messenger RNA: a mutant of *Escherichia coli* with altered mRNA stability. *Mol Gen Genet* **154**, 279-285.
- Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lahiri, S.D. und Allison, L.A.** (2000). Complementary expression of two plastid-localized sigma-like factors in maize. *Plant Physiol* **123**, 883-894.
- Lamb, H.K., Leslie, K., Dodds, A.L., Nutley, M., Cooper, A., Johnson, C., Thompson, P., Stammers, D.K. und Hawkins, A.R.** (2003). The negative transcriptional regulator NmrA discriminates between oxidized and reduced dinucleotides. *J Biol Chem* **278**, 32107-32114.
- 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.
- Leister, D.** (2003). Chloroplast research in the genomic age. *Trends Genet* **19**, 47-56.
- Lennartz, K., Plücker, H., Seidler, A., Westhoff, P., Bechtold, N. und Meierhoff, K.** (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 U S A* **90**, 5509-5513.
- Leto, J.L. und Miles, D.** (1980). Characterization of three photosystem II Mutants in *Zea mays* L. lacking a 32,000 Dalton lamellar polypeptide. *Plant Physiol* **66**, 18-24.
- Letunic, I., Copley, R.R., Schmidt, S., Ciccarelli, F.D., Doerks, T., Schultz, J., Ponting, C.P. und Bork, P.** (2004). SMART 4.0: towards genomic data integration. *Nucleic Acids Res* **32**, D142-144.
- Levy, H., Kindle, K.L. und Stern, D.B.** (1999). Target and specificity of a nuclear gene product that participates in mRNA 3'-end formation in *Chlamydomonas* chloroplasts. *J Biol Chem* **274**, 35955-35962.
- Lezhneva, L. und Meurer, J.** (2004). The nuclear factor HCF145 affects chloroplast psaA-psaB-rps14 transcript abundance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **38**, 740-753.
- Li, F., Holloway, S.P., Lee, J. und Herrin, D.L.** (2002). Nuclear genes that promote splicing of group I introns in the chloroplast 23S rRNA and psbA genes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J* **32**, 467-480.

- Li, X., Henry, R., Yuan, J., Cline, K. und Hoffman, N.E.** (1995). A chloroplast homologue of the signal recognition particle subunit SRP54 is involved in the posttranslational integration of a protein into thylakoid membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 3789-3793.
- Li, Y.Q. und Sugiura, M.** (1990). Three distinct ribonucleoproteins from tobacco chloroplasts: each contains a unique amino terminal acidic domain and two ribonucleoprotein consensus motifs. *Embo J* **9**, 3059-3066.
- Liere, K. und Link, G.** (1997). Chloroplast endoribonuclease p54 involved in RNA 3'-end processing is regulated by phosphorylation and redox state. *Nucleic Acids Res* **25**, 2403-2408.
- Liere, K. und Maliga, P.** (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.
- Lisitsky, I., Klaff, P. und Schuster, G.** (1996). Addition of destabilizing poly (A)-rich sequences to endonuclease cleavage sites during the degradation of chloroplast mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 13398-13403.
- Lisitsky, I., Klaff, P. und Schuster, G.** (1997). Blocking polyadenylation of mRNA in the chloroplast inhibits its degradation. *Plant J.* **12**.
- Ma, L. und Spremulli, L.L.** (1990). Identification and characterization of large, complex forms of chloroplast translational initiation factor 2 from *Euglena gracilis*. *J Biol Chem* **265**, 13560-13565.
- MacKinney, G.** (1941). Absorption of light by chlorophyll solutions. *J Biol Chem* **140**, 315-322.
- Maier, R.M., Neckermann, K., Igloi, G.L. und Kossel, H.** (1995). Complete sequence of the maize chloroplast genome: gene content, hotspots of divergence and fine tuning of genetic information by transcript editing. *J Mol Biol* **251**, 614-628.
- Maliga, P.** (1998). Two plastid RNA polymerases of higher plants: an evolving story. *Trends in Plant Science* **3**, 4-6.
- Martin, W., Stoebe, B., Goremykin, V., Hapsmann, S., Hasegawa, M. und Kowallik, K.V.** (1998). Gene transfer to the nucleus and the evolution of chloroplasts. *Nature* **393**, 162-165.
- Martin, W., Rujan, T., Richly, E., Hansen, A., Cornelsen, S., Lins, T., Leister, D., Stoebe, B., Hasegawa, M. und Penny, D.** (2002). Evolutionary analysis of Arabidopsis, cyanobacterial, and chloroplast genomes reveals plastid phylogeny and thousands of cyanobacterial genes in the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 12246-12251.
- Mattoo, A.K., Hoffmann-Falk, H., Marder, J.B. und Edelman, M.** (1984). Regulation of protein metabolism: Coupling of photosynthetic electron transport to in vivo degradation of the rapidly metabolized 32-kilodalton protein of the chloroplast membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 1380-1384.
- Maul, J.E., Lilly, J.W., Cui, L., dePamphilis, C.W., Miller, W., Harris, E.H. und Stern, D.B.** (2002). The *Chlamydomonas reinhardtii* plastid chromosome: islands of genes in a sea of repeats. *Plant Cell* **14**, 2659-2679.
- Mayfield, S.P., Cohen, A., Danon, A. und Yohn, C.B.** (1994). Translation of the psbA mRNA of *Chlamydomonas reinhardtii* requires a structured RNA element contained within the 5' untranslated region. *J Cell Biol* **127**, 1537-1545.
- McMaster, G.K. und Carmichael, G.G.** (1977). Analysis of single and double-stranded nucleic acids on polyacrylamide agarose gels by using glyoxal and acridin orange. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 4835-4838.

- Meeks, J.C., Elhai, J., Thiel, T., Potts, M., Larimer, F., Lamerdin, J., Predki, P. und Atlas, R.** (2001). An overview of the genome of *Nostoc punctiforme*, a multicellular, symbiotic cyanobacterium. *Photosynth Res* **70**, 85-106.
- Meierhoff, K., Felder, S., Nakamura, T., Bechtold, N. und Schuster, G.** (2003). HCF152, an Arabidopsis RNA binding pentatricopeptide repeat protein involved in the processing of chloroplast psbB-psbT-psbH-petB-petD RNAs. *Plant Cell* **15**, 1480-1495.
- Memon, A.R., Meng, B. und Mullet, J.E.** (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.
- Merendino, L., Falciatore, A. und Rochaix, J.D.** (2003). Expression and RNA binding properties of the chloroplast ribosomal protein S1 from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Mol Biol* **53**, 371-382.
- Mereschkowsky, C.** (1905). Über die Natur und den Ursprung der Chromatophoren im Pflanzenreiche. Englische Übersetzung: *Eur. J. Phycol.*, 1999, 34, 287-295 **25**, 593-604.
- Meurer, J., Berger, A. und Westhoff, P.** (1996a). A nuclear mutant of Arabidopsis with impaired stability on distinct transcripts of the plastid psbB, psbD/C, ndhH, and ndhC operons. *Plant Cell* **8**, 1193-1207.
- Meurer, J., Meierhoff, K. und Westhoff, P.** (1996b). Isolation of high-chlorophyll-fluorescence mutants of Arabidopsis thaliana and their characterisation by spectroscopy, immunoblotting and northern hybridisation. *Planta* **198**, 385-396.
- Meurer, J., Plücker, H., Kowallik, K.V. und Westhoff, P.** (1998). A nuclear-encoded protein of prokaryotic origin is essential for the stability of photosystem II in Arabidopsis thaliana. *Embo J* **17**, 5286-5297.
- Meurer, J., Lezhneva, L., Amann, K., Godel, M., Bezhani, S., Sherameti, I. und Oelmüller, R.** (2002). A peptide chain release factor 2 affects the stability of UGA-containing transcripts in Arabidopsis chloroplasts. *Plant Cell* **14**, 3255-3269.
- Miles, D.** (1982). The use of mutations to probe photosynthesis in higher plants. In Edelman, M., Hallick, R. and Chua, N.-H. (eds), *Methods in Chloroplast Molecular Biology*, Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, The Netherlands, 75-107.
- Miyamoto, T., Obokata, J. und Sugiura, M.** (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**, 6726-6734.
- Miyamoto, T., Obokata, J. und Sugiura, M.** (2004). A site-specific factor interacts directly with its cognate RNA editing site in chloroplast transcripts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 48-52.
- Monde, R.A., Schuster, G. und Stern, D.B.** (2000). Processing and degradation of chloroplast mRNA. *Biochimie* **82**, 573-582.
- Morais, F., Barber, J. und Nixon, P.J.** (1998). The chloroplast-encoded alpha subunit of cytochrome b-559 is required for assembly of the photosystem two complex in both the light and the dark in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Biol Chem* **273**, 29315-29320.
- Morikawa, K., Ito, S., Tsunoyama, Y., Nakahira, Y., Shiina, T. und Toyoshima, Y.** (1999). Circadian-regulated expression of a nuclear-encoded plastid sigma factor gene (sigA) in wheat seedlings. *FEBS Lett* **451**, 275-278.
- Müller, B. und Eichacker, L.A.** (1999). Assembly of the D1 precursor in monomeric photosystem II reaction center precomplexes precedes chlorophyll a-triggered accumulation of reaction center II in barley etioplasts. *Plant Cell* **11**, 2365-2377.
- Mullet, J.E.** (1993). Dynamic regulation of chloroplast transcription. *Plant Physiol* **103**, 309-313.

- Mullet, J.E., Klein, P.G. und Klein, R.R.** (1990). Chlorophyll regulates accumulation of the plastid-encoded chlorophyll apoproteins CP43 and D1 by increasing apoprotein stability. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 4038-4042.
- Murashige, T. und Skoog, F.** (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* **15**, 473-497.
- Nagy, E., Henics, T., Eckert, M., Miseta, A., Lightowers, R.N. und Kellermayer, M.** (2000). Identification of the NAD(+)-binding fold of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as a novel RNA-binding domain. *Biochem Biophys Res Commun* **275**, 253-260.
- Nakamura, T., Ohta, M., Sugiura, M. und Sugita, M.** (2001). Chloroplast ribonucleoproteins function as a stabilizing factor of ribosome-free mRNAs in the stroma. *J Biol Chem* **276**, 147-152.
- Nakamura, T., Meierhoff, K., Westhoff, P. und Schuster, G.** (2003). RNA-binding properties of HCF152, an Arabidopsis PPR protein involved in the processing of chloroplast RNA. *Eur J Biochem* **270**, 4070-4081.
- Nelson, N. und Ben-Shem, A.** (2004). The complex architecture of oxygenic photosynthesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 971-982.
- Nickelsen, J.** (1999). Transcripts containing the 5' untranslated regions of the plastid genes *psbA* and *psbB* from higher plants are unstable in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts. *Mol Gen Genet* **262**, 768-771.
- Nickelsen, J.** (2003). Chloroplast RNA-binding proteins. *Curr Genet* **43**, 392-399.
- Nickelsen, J. und Link, G.** (1991). RNA-protein interactions at transcript 3' ends and evidence for *trnK-psbA* cotranscription in mustard chloroplasts. *Mol Gen Genet* **228**, 89-96.
- Nickelsen, J. und Link, G.** (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., Fleischmann, M., Boudreau, E., Rahire, M. und Rochaix, J.D.** (1999). Identification of cis-acting RNA leader elements required for chloroplast *psbD* gene expression in *Chlamydomonas*. *Plant Cell* **11**, 957-970.
- Nierhaus, K.H. und Wittmann, H.G.** (1980). Ribosomal function and its inhibition by antibiotics in prokaryotes. *Naturwissenschaften* **67**, 234-250.
- Ohta, M., Sugita, M. und Sugiura, M.** (1995). Three types of nuclear genes encoding chloroplast RNA-binding proteins (*cp29*, *cp31* and *cp33*) are present in *Arabidopsis thaliana*: presence of *cp31* in chloroplasts and its homologue in nuclei/cytoplasm. *Plant Mol Biol* **27**, 529-539.
- Oikawa, K., Tanaka, K. und Takahashi, H.** (1998). Two types of differentially photo-regulated nuclear genes that encode sigma factors for chloroplast RNA polymerase in the red alga *Cyanidium caldarium* strain RK-1. *Gene* **210**, 277-285.
- Ono, M. und Kuwano, M.** (1979). A conditional lethal mutation in an *Escherichia coli* strain with a longer chemical lifetime of messenger RNA. *J Mol Biol* **129**, 343-357.
- Oppermann, U., Filling, C., Hult, M., Shafqat, N., Wu, X., Lindh, M., Shafqat, J., Nordling, E., Kallberg, Y., Persson, B. und Jörnvall, H.** (2003). Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR): the 2002 update. *Chem Biol Interact* **143-144**, 247-253.
- Ossenbühl, F. und Nickelsen, J.** (2000). cis- and trans-Acting determinants for translation of *psbD* mRNA in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol Cell Biol* **20**, 8134-8142.
- Ossenbühl, F., Hartmann, K. und Nickelsen, J.** (2002). A chloroplast RNA binding protein from stromal thylakoid membranes specifically binds to the 5' untranslated region of the *psbA* mRNA. *Eur J Biochem* **269**, 3912-3919.

- Ostheimer, G.J., Hadjivasiliou, H., Kloer, D.P., Barkan, A. und Matthews, B.W.** (2005). Structural analysis of the group II intron splicing factor CRS2 yields insights into its protein and RNA interaction surfaces. *J Mol Biol* **345**, 51-68.
- Ostheimer, G.J., Williams-Carrier, R., Belcher, S., Osborne, E., Gierke, J. und Barkan, A.** (2003). Group II intron splicing factors derived by diversification of an ancient RNA-binding domain. *Embo J* **22**, 3919-3929.
- Pereira, P.J., Macedo-Ribeiro, S., Parraga, A., Perez-Luque, R., Cunningham, O., Darcy, K., Mantle, T.J. und Coll, M.** (2001). Structure of human biliverdin IXbeta reductase, an early fetal bilirubin IXbeta producing enzyme. *Nat Struct Biol* **8**, 215-220.
- Perron, K., Goldschmidt-Clermont, M. und Rochaix, J.D.** (1999). A factor related to pseudouridine synthases is required for chloroplast group II intron trans-splicing in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Embo J* **18**, 6481-6490.
- Perron, K., Goldschmidt-Clermont, M. und Rochaix, J.D.** (2004). A multiprotein complex involved in chloroplast group II intron splicing. *Rna* **10**, 704-711.
- Persson, B., Kallberg, Y., Oppermann, U. und Jörnvall, H.** (2003). Coenzyme-based functional assignments of short-chain dehydrogenases/reductases (SDRs). *Chem Biol Interact* **143-144**, 271-278.
- Pfannschmidt, T., Nilsson, A., Tullberg, A., Link, G. und Allen, J.F.** (1999). Direct transcriptional control of the chloroplast genes *psbA* and *psaAB* adjusts photosynthesis to light energy distribution in plants. *IUBMB Life* **48**, 271-276.
- Plücken, H., Müller, B., Grohmann, D., Westhoff, P. und Eichacker, L.A.** (2002). The HCF136 protein is essential for assembly of the photosystem II reaction center in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett* **532**, 85-90.
- Possingham, J.V.** (1980). Plastid replication and development in the life cycle of higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **31**, 113-129.
- Puig, O., Caspary, F., Rigaut, G., Rutz, B., Bouveret, E., Bragado-Nilsson, E., Wilm, M. und Seraphin, B.** (2001). The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods* **24**, 218-229.
- Ramakrishnan, V.** (2002). Ribosome structure and the mechanism of translation. *Cell* **108**, 557-572.
- Rapp, J.C., Baumgartner, B.J. und Mullet, J.** (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.
- Rattanachaikunsopon, P., Rosch, C. und Kuchka, M.R.** (1999). Cloning and characterization of the nuclear AC115 gene of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Mol Biol* **39**, 1-10.
- Regnier, P., Grunberg-Manago, M. und Portier, C.** (1987). Nucleotide sequence of the *pnp* gene of *Escherichia coli* encoding polynucleotide phosphorylase. Homology of the primary structure of the protein with the RNA-binding domain of ribosomal protein S1. *J Biol Chem* **262**, 63-68.
- Ringquist, S., Jones, T., Snyder, E.E., Gibson, T., Boni, I. und Gold, L.** (1995). High-affinity RNA ligands to *Escherichia coli* ribosomes and ribosomal protein S1: comparison of natural and unnatural binding sites. *Biochemistry* **34**, 3640-3648.
- Rivier, C., Goldschmidt-Clermont, M. und Rochaix, J.D.** (2001). Identification of an RNA-protein complex involved in chloroplast group II intron trans-splicing in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Embo J* **20**, 1765-1773.
- Robinson, C., Thompson, S.J. und Woolhead, C.** (2001). Multiple pathways used for the targeting of thylakoid proteins in chloroplasts. *Traffic* **2**, 245-251.

- Rochaix, J.D., Kuchka, M., Mayfield, S., Schirmer-Rahire, M., Girard-Bascou, J. und Bennoun, P.** (1989). Nuclear and chloroplast mutations affect the synthesis or stability of the chloroplast psbC gene product in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Embo J* **8**, 1013-1021.
- Rosso, M.G., Li, Y., Strizhov, N., Reiss, B., Dekker, K. und Weisshaar, B.** (2003). An *Arabidopsis thaliana* T-DNA mutagenized population (GABI-Kat) for flanking sequence tag-based reverse genetics. *Plant Mol Biol* **53**, 247-259.
- Rott, R., Drager, R.G., Stern, D.B. und Schuster, G.** (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., Levy, H., Drager, R.G., Stern, D.B. und Schuster, G.** (1998a). 3'-Processed mRNA is preferentially translated in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts. *Mol Cell Biol* **18**, 4605-4611.
- Rott, R., Liveanu, V., Drager, R.G., Stern, D.B. und Schuster, G.** (1998b). The sequence and structure of the 3'-untranslated regions of chloroplast transcripts are important determinants of mRNA accumulation and stability. *Plant Mol Biol* **36**, 307-314.
- Rott, R., Liveanu, V., Drager, R.G., Higgs, D., Stern, D.B. und Schuster, G.** (1999). Altering the 3' UTR endonucleolytic cleavage site of a *Chlamydomonas* chloroplast mRNA affects 3-end maturation in vitro but not in vivo. *Plant Mol Biol* **40**, 679-686.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. und Erlich, H.A.** (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.
- Sakamoto, W., Sturm, N.R., Kindle, K.L. und Stern, D.B.** (1994a). petD mRNA maturation in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts: role of 5' endonucleolytic processing. *Mol Cell Biol* **14**, 6180-6186.
- Sakamoto, W., Chen, X., Kindle, K.L. und Stern, D.B.** (1994b). Function of the *Chlamydomonas reinhardtii* petd 5' untranslated region in regulating the accumulation of subunit IV of the cytochrome b6/f complex. *Plant J* **6**, 503-512.
- Saldanha, R., Mohr, G., Belfort, M. und Lambowitz, A.M.** (1993). Group I and group II introns. *Faseb J* **7**, 15-24.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T.** (1989). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* (Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Sanchirico, M.E., Fox, T.D. und Mason, T.L.** (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., Stein, B. und Westhoff, P.** (2005). The nuclear gene HCF107 encodes a membrane-associated R-TPR (RNA tetratricopeptide repeat)-containing protein involved in expression of the plastidial psbH gene in *Arabidopsis*. *Plant J.* **42**, 720-730.
- Sasaki, T., Yukawa, Y., Miyamoto, T., Obokata, J. und Sugiura, M.** (2003). Identification of RNA editing sites in chloroplast transcripts from the maternal and paternal progenitors of tobacco (*Nicotiana tabacum*): comparative analysis shows the involvement of distinct trans-factors for ndhB editing. *Mol Biol Evol* **20**, 1028-1035.
- Sato, M.H. und Wada, Y.** (1997). Universal template plasmid for introduction of the triple-HA epitope sequence into cloned genes. *Biotechniques* **23**, 254-256.
- Sato, S., Nakamura, Y., Kaneko, T., Asamizu, E. und Tabata, S.** (1999). Complete structure of the chloroplast genome of *Arabidopsis thaliana*. *DNA Res* **6**, 283-290.

- Satoh, K.** (2003). The identification of the Photosystem II reaction center: a personal story. *Photosynthesis Research* **76**, 233-240.
- Sävenstrand, H., Brosché, M. und Strid, A.** (2002). Regulation of gene expression by low levels of ultraviolet-B radiation in *Pisum sativum*: isolation of novel genes by suppression subtractive hybridisation. *Plant Cell Physiol* **43**, 402-410.
- Schägger, H. und von Jagow, G.** (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., Cramer, W.A. und von Jagow, G.** (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.
- Schlünzen, F., Harms, J.M., Franceschi, F., Hansen, H.A., Bartels, H., Zarivach, R. und Yonath, A.** (2003). Structural basis for the antibiotic activity of ketolides and azalides. *Structure (Camb)* **11**, 329-338.
- Schlünzen, F., Zarivach, R., Harms, J., Bashan, A., Tocilj, A., Albrecht, R., Yonath, A. und Franceschi, F.** (2001). Structural basis for the interaction of antibiotics with the peptidyl transferase centre in eubacteria. *Nature* **413**, 814-821.
- Schöneberg, U., Vahrson, W., Priedemuth, P. und Wittig, B.** (1994). Analysis and interpretation of DNA and protein sequences using MacMolly Tetra. (Bielefeld: Karoi-Verl Bornemann).
- Schreiber, U.** (1986). Detection of rapid induction kinetics with a new type of high-frequency modulated chlorophyll fluorometer. *Photosynth Res* **9**, 261-272.
- Schreiber, U., Schliwa, U. und Bilger, W.** (1986). Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynth Res* **10**, 51-62.
- Schreiber, U., Klughammer, C. und Neubauer, C.** (1988). Measuring P700 absorbance changes around 800 nm with a new type of pulse modulation system. *Z. Naturforsch.* **43**, 686-698.
- Schuenemann, D., Amin, P., Hartmann, E. und Hoffman, N.E.** (1999). Chloroplast SecY is complexed to SecE and involved in the translocation of the 33-kDa but not the 23-kDa subunit of the oxygen-evolving complex. *J Biol Chem* **274**, 12177-12182.
- Schünemann, D.** (2004). Structure and function of the chloroplast signal recognition particle. *Curr Genet* **44**, 295-304.
- Schuster, G. und Gruissem, W.** (1991). Chloroplast mRNA 3' end processing requires a nuclear-encoded RNA-binding protein. *Embo J* **10**, 1493-1502.
- Schuster, G., Lisitsky, I. und Klaff, P.** (1999). Polyadenylation and degradation of mRNA in the chloroplast. *Plant Physiol* **120**, 937-944.
- Seelert, H., Poetsch, A., Dencher, N.A., Engel, A., Stahlberg, H. und Muller, D.J.** (2000). Structural biology. Proton-powered turbine of a plant motor. *Nature* **405**, 418-419.
- Shen, Y., Danon, A. und Christopher, D.A.** (2001). RNA binding-proteins interact specifically with the Arabidopsis chloroplast psbA mRNA 5' untranslated region in a redox-dependent manner. *Plant Cell Physiol* **42**, 1071-1078.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O. und Mann, M.** (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* **68**, 850-858.
- Smith, S.M., Fulton, D.C., Chia, T., Thorneycroft, D., Chapple, A., Dunstan, H., Hylton, C., Zeeman, S.C. und Smith, A.M.** (2004). Diurnal changes in the transcriptome encoding enzymes of

starch metabolism provide evidence for both transcriptional and posttranscriptional regulation of starch metabolism in *Arabidopsis* leaves. *Plant Physiol* **136**, 2687-2699.

Sofer, W. und Ursprung, H. (1968). *Drosophila* alcohol dehydrogenase. Purification and partial characterization. *J Biol Chem* **243**, 3110-3115.

Somanchi, A., Barnes, D. und Mayfield, S.P. (2005). A nuclear gene of *Chlamydomonas reinhardtii*, *Tba1*, encodes a putative oxidoreductase required for translation of the chloroplast *psbA* mRNA. *Plant J* **42**, 341-352.

Stammers, D.K., Ren, J., Leslie, K., Nichols, C.E., Lamb, H.K., Cocklin, S., Dodds, A. und Hawkins, A.R. (2001). The structure of the negative transcriptional regulator *NmrA* reveals a structural superfamily which includes the short-chain dehydrogenase/reductases. *Embo J* **20**, 6619-6626.

Stern, D.B. und Gruissem, W. (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. und Kindle, K.L. (1993). 3' end maturation of the *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast *atpB* mRNA is a two-step process. *Mol Cell Biol* **13**, 2277-2285.

Stern, D.B., Jones, H. und Gruissem, W. (1989). Function of plastid mRNA 3' inverted repeats. RNA stabilization and gene-specific protein binding. *J Biol Chem* **264**, 18742-18750.

Stern, D.B., Radwanski, E.R. und Kindle, K.L. (1991). A 3' stem/loop structure of the *Chlamydomonas* chloroplast *atpB* gene regulates mRNA accumulation in vivo. *Plant Cell* **3**, 285-297.

Stroebel, D., Choquet, Y., Popot, J.L. und Picot, D. (2003). An atypical haem in the cytochrome b(6)f complex. *Nature* **426**, 413-418.

Subramanian, A.R. (1983). Structure and functions of ribosomal protein S1. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **28**, 101-142.

Sugita, M. und Sugiura, M. (1996). Regulation of gene expression in chloroplasts of higher plants. *Plant Mol Biol* **32**, 315-326.

Sugiura, M., Hirose, T. und Sugita, M. (1998). Evolution and mechanism of translation in chloroplasts. *Annu Rev Genet* **32**, 437-459.

Sundby, C., McCaffery, S. und Anderson, J.M. (1993). Turnover of the photosystem II D1 protein in higher plants under photoinhibitory and nonphotoinhibitory irradiance. *J Biol Chem* **268**, 25476-25482.

Tan, S. und Troxler, R.F. (1999). Characterization of two chloroplast RNA polymerase sigma factors from *Zea mays*: photoregulation and differential expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 5316-5321.

Tanaka, K., Oikawa, K., Ohta, N., Kuroiwa, H., Kuroiwa, T. und Takahashi, H. (1996). Nuclear encoding of a chloroplast RNA polymerase sigma subunit in a red alga. *Science* **272**, 1932-1935.

Tatusov, R.L., Galperin, M.Y., Natale, D.A. und Koonin, E.V. (2000). The COG database: a tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution. *Nucleic Acids Res* **28**, 33-36.

Tatusov, R.L., Fedorova, N.D., Jackson, J.D., Jacobs, A.R., Kiryutin, B., Koonin, E.V., Krylov, D.M., Mazumder, R., Mekhedov, S.L., Nikolskaya, A.N., Rao, B.S., Smirnov, S., Sverdlov, A.V., Vasudevan, S., Wolf, Y.I., Yin, J.J. und Natale, D.A. (2003). The COG database: an updated version includes eukaryotes. *BMC Bioinformatics* **4**, 41.

Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. und Higgins, D.G. (1997). The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* **25**, 4876-4882.

- Thompson, S.J., Robinson, C. und Mant, A.** (1999). Dual signal peptides mediate the signal recognition particle/Sec-independent insertion of a thylakoid membrane polyprotein, PsbY. *J Biol Chem* **274**, 4059-4066.
- Till, B., Schmitz-Linneweber, C., Williams-Carrier, R. und Barkan, A.** (2001). CRS1 is a novel group II intron splicing factor that was derived from a domain of ancient origin. *Rna* **7**, 1227-1238.
- Timmis, J.N., Ayliffe, M.A., Huang, C.Y. und Martin, W.** (2004). Endosymbiotic gene transfer: organelle genomes forge eukaryotic chromosomes. *Nat Rev Genet* **5**, 123-135.
- Tissier, C., Woolhead, C.A. und Robinson, C.** (2002). Unique structural determinants in the signal peptides of "spontaneously" inserting thylakoid membrane proteins. *Eur J Biochem* **269**, 3131-3141.
- Töller, T.** (1999). mRNA-Metabolismus in Chloroplasten von *Arabidopsis thaliana*. In Institut für physikalische Biologie (Düsseldorf: Heinrich-Heine-Universität), pp. 79.
- Towbin, H., Staehelin, T. und Gordon, J.** (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 4350-4354.
- Tozawa, Y., Tanaka, K., Takahashi, H. und Wakasa, K.** (1998). Nuclear encoding of a plastid sigma factor in rice and its tissue- and light-dependent expression. *Nucleic Acids Res* **26**, 415-419.
- Tsudzuki, T., Wakasugi, T. und Sugiura, M.** (2001). Comparative analysis of RNA editing sites in higher plant chloroplasts. *J Mol Evol* **53**, 327-332.
- Vaistij, F.E., Goldschmidt-Clermont, M., Wostrikoff, K. und Rochaix, J.D.** (2000a). Stability determinants in the chloroplast psbB/T/H mRNAs of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J* **21**, 469-482.
- Vaistij, F.E., Boudreau, E., Lemaire, S.D., Goldschmidt-Clermont, M. und Rochaix, J.D.** (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 U S A* **97**, 14813-14818.
- van Kooten, O. und Snel, J.F.H.** (1990). The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. *Photosynth Res* **25**, 147-150.
- van Wijk, K.J. und Eichacker, L.** (1996). Light is required for efficient translation elongation and subsequent integration of the D1-protein into photosystem II. *FEBS Lett* **388**, 89-93.
- van Wijk, K.J., Andersson, B. und Aro, E.M.** (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.
- Vazquez, D.** (1979). Inhibitors of protein biosynthesis. (New York: Springer-Verlag).
- Viitanen, P.V., Doran, E.R. und Dunsmuir, P.** (1988). What is the role of the transit peptide in thylakoid integration of the light-harvesting chlorophyll a/b protein? *J Biol Chem* **263**, 15000-15007.
- Walter, M., Kilian, J. und Kudla, J.** (2002). PNPase activity determines the efficiency of mRNA 3'-end processing, the degradation of tRNA and the extent of polyadenylation in chloroplasts. *Embo J* **21**, 6905-6914.
- Wang, C.C. und Spremulli, L.L.** (1991). Chloroplast translational initiation factor 3. Purification and characterization of multiple forms from *Euglena gracilis*. *J Biol Chem* **266**, 17079-17083.
- Weihe, A. und Börner, T.** (1999). Transcription and the architecture of promoters in chloroplasts. *Trends in Plant Science* **4**, 169-170.
- Wessels, J.S.C.** (1962). Separation of the two photochemical systems of photosynthesis by digitonin fragmentation. *Biochim Biophys Acta* **65**, 561-564.

- Westhoff, P. und Herrmann, R.G.** (1988). Complex RNA maturation in chloroplasts. The psbB operon from spinach. *Eur J Biochem* **171**, 551-564.
- Westhoff, P., Offermann-Steinhard, K., Höfer, M., Eskins, K., Oswald, A. und Streubel, M.** (1991). Differential accumulation of plastid transcripts encoding photosystem II components in the mesophyll and bundle-sheath cells of monocotyledonous NADP-malic enzyme-type C4 plants. *Planta* **184**, 377-388.
- Wexler, M., Bogsch, E.G., Klosgen, R.B., Palmer, T., Robinson, C. und Berks, B.C.** (1998). Targeting signals for a bacterial Sec-independent export system direct plant thylakoid import by the delta pH pathway. *FEBS Lett* **431**, 339-342.
- Williams, P.M. und Barkan, A.** (2003). A chloroplast-localized PPR protein required for plastid ribosome accumulation. *Plant J* **36**, 675-686.
- Wollman, F.A., Minai, L. und Nechushtai, R.** (1999). The biogenesis and assembly of photosynthetic proteins in thylakoid membranes. *Biochim Biophys Acta* **1411**, 21-85.
- Wolosiuk, R.A., Ballicora, M.A. und Hagelin, K.** (1993). The reductive pentose phosphate cycle for photosynthetic CO₂ assimilation: enzyme modulation. *Faseb J* **7**, 622-637.
- Yamaguchi, K. und Subramanian, A.R.** (2003). Proteomic identification of all plastid-specific ribosomal proteins in higher plant chloroplast 30S ribosomal subunit. *Eur J Biochem* **270**, 190-205.
- Yamaguchi, K., von Knoblauch, K. und Subramanian, A.R.** (2000). The plastid ribosomal proteins. Identification of all the proteins in the 30 S subunit of an organelle ribosome (chloroplast). *J Biol Chem* **275**, 28455-28465.
- Yamaguchi, K., Prieto, S., Beligni, M.V., Haynes, P.A., McDonald, W.H., Yates, J.R., 3rd und Mayfield, S.P.** (2002). Proteomic characterization of the small subunit of *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast ribosome: identification of a novel S1 domain-containing protein and unusually large orthologs of bacterial S2, S3, and S5. *Plant Cell* **14**, 2957-2974.
- Yamaguchi, K., Beligni, M.V., Prieto, S., Haynes, P.A., McDonald, W.H., Yates, J.R., 3rd und Mayfield, S.P.** (2003). Proteomic characterization of the *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast ribosome. Identification of proteins unique to the e70 S ribosome. *J Biol Chem* **278**, 33774-33785.
- Yang, J. und Stern, D.B.** (1997). The spinach chloroplast endoribonuclease CSP41 cleaves the 3'-untranslated region of petD mRNA primarily within its terminal stem-loop structure. *J Biol Chem* **272**, 12874-12880.
- Yang, J., Schuster, G. und Stern, D.B.** (1996). CSP41, a sequence-specific chloroplast mRNA binding protein, is an endoribonuclease. *Plant Cell* **8**, 1409-1420.
- Ye, L.H., Li, Y.Q., Fukami-Kobayashi, K., Go, M., Konishi, T., Watanabe, A. und Sugiura, M.** (1991). Diversity of a ribonucleoprotein family in tobacco chloroplasts: two new chloroplast ribonucleoproteins and a phylogenetic tree of ten chloroplast RNA-binding domains. *Nucleic Acids Res* **19**, 6485-6490.
- Yehudai-Resheff, S., Hirsh, M. und Schuster, G.** (2001). Polynucleotide phosphorylase functions as both an exonuclease and a poly(A) polymerase in spinach chloroplasts. *Mol Cell Biol* **21**, 5408-5416.
- Yehudai-Resheff, S., Portnoy, V., Yogev, S., Adir, N. und Schuster, G.** (2003). Domain analysis of the chloroplast polynucleotide phosphorylase reveals discrete functions in RNA degradation, polyadenylation, and sequence homology with exosome proteins. *Plant Cell* **15**, 2003-2019.
- Yohn, C.B., Cohen, A., Danon, A. und Mayfield, S.P.** (1996). Altered mRNA binding activity and decreased translational initiation in a nuclear mutant lacking translation of the chloroplast psbA mRNA. *Mol Cell Biol* **16**, 3560-3566.

- Yohn, C.B., Cohen, A., Danon, A. und Mayfield, S.P.** (1998a). A poly(A) binding protein functions in the chloroplast as a message-specific translation factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 2238-2243.
- Yohn, C.B., Cohen, A., Rosch, C., Kuchka, M.R. und Mayfield, S.P.** (1998b). Translation of the chloroplast psbA mRNA requires the nuclear-encoded poly(A)-binding protein, RB47. *J Cell Biol* **142**, 435-442.
- Yuan, J., Henry, R., McCaffery, M. und Cline, K.** (1994). SecA homolog in protein transport within chloroplasts: evidence for endosymbiont-derived sorting. *Science* **266**, 796-798.
- Zerges, W.** (2000). Translation in chloroplasts. *Biochimie* **82**, 583-601.
- Zerges, W. und Rochaix, J.D.** (1998). Low density membranes are associated with RNA-binding proteins and thylakoids in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Cell Biol* **140**, 101-110.
- Zhang, L., Paakkari, V., van Wijk, K.J. und Aro, E.M.** (2000). Biogenesis of the chloroplast-encoded D1 protein: regulation of translation elongation, insertion, and assembly into photosystem II. *Plant Cell* **12**, 1769-1782.
- Zimmermann, P., Hirsch-Hoffmann, M., Hennig, L. und Gruissem, W.** (2004). GENEVESTIGATOR. Arabidopsis microarray database and analysis toolbox. *Plant Physiol* **136**, 2621-2632.
- Zito, F., Kuras, R., Choquet, Y., Kossel, H. und Wollman, F.A.** (1997). Mutations of cytochrome b6 in *Chlamydomonas reinhardtii* disclose the functional significance for a proline to leucine conversion by petB editing in maize and tobacco. *Plant Mol Biol* **33**, 79-86.
- Zou, Z., Eibl, C. und Koop, H.U.** (2003). The stem-loop region of the tobacco psbA 5'UTR is an important determinant of mRNA stability and translation efficiency. *Mol Genet Genomics* **269**, 340-349.

Ich möchte mich herzlich bedanken bei...

... Prof. Dr. P. Westhoff für die interessante Themenstellung, die Betreuung dieser Arbeit mit vielen hilfreichen Diskussionen und unterstützenden Worten und sein immer offenes Ohr, selbst zwischen Tür und Angel.

... Prof. Dr. G. Groth für die Übernahme des Koreferates.

... Dr. Karin Meierhoff für die *hcf*-Mutante, die im Vorfeld gesammelten Ergebnisse und ihre Hilfestellung, besonders zu Beginn der Arbeit.

... der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. L. Eichacker an der Ludwig-Maximilians-Universität, insbesondere Veronika Reisinger und Bernhard Granvogel, für drei schöne und lustige Wochen in München und die Einweihung in die Geheimnisse der Blue-Native-Gelelektrophorese.

... der Arbeitsgruppe von Prof. R. Simon, die meinen Pflanzen immer Asyl in der Klimakammer gewährt hat.

... Susanne Paradies, dass sie mir ihr „Baby“ überlassen und mir hoffentlich verzeihen hat, dass ich ihren Namen auf meinem ersten Poster vergessen habe.

... der besten und immer gut gelaunten Sekretärin Marianne Limpert, ohne die mancher Kampf mit der Bürokratie verloren gegangen wäre.

... meinen Ex-Diplomandinnen Anne Kempken und Julia Farr für manch turbulente, aber auch lustige Stunde und natürlich fürs Blümchen gießen. Mädels, wenn Ihr das hier lest, ist es Zeit für Cocktails!

... meinen Mitstreitern Bernhard Stein und Sabine Bossmann an der HCF-Kaltraum- und Affinitätschromatographiefront.

... der übrigen Besetzung des Hauptlabors II, deren Arbeitsplätze ich mir Untertan gemacht habe...

... allen jetzigen und ehemaligen Mitgliedern der Botanik IV für eine angenehme Arbeitsatmosphäre, viele Ratschläge und Diskussionen und das Ertragen meines Chaos.

... allen Angestellten des Dachgewächshauses, insbesondere Herrn Rogmann und Herrn Baum, für die Pflege meiner Pflanzen.

... meinen Eltern für ihre Unterstützung während meines gesamten Studiums und ihrer steten Überzeugung, dass ich doch noch irgendwann meine Promotion erfolgreich beende ;o).

... Sascha Engelmann, dem Mann an meiner Seite. Vielen Dank für Deine immer offenen Arme und Deinen unumstößlichen Glauben an mich. Ohne Dich wäre dieser Weg sehr schwierig gewesen.

Eidesstattliche Erklärung:

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, Oktober 2005

Kerstin Schult